

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse de doctorat

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille I

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue publiquement par

Ingrid MARCHAL



le 21 septembre 2001

Modification des capacités de glycosylation des cellules d'insectes

Directeur de thèse : Professeur René Cacan
Unité Mixte de Recherche n°8576 du CNRS et de l'USTL
Villeneuve d'Ascq

JURY

Monsieur le Professeur Philippe Delannoy

Monsieur le Professeur Roland Schauer

Monsieur le Docteur Rafael Oriol

Madame le Docteur Martine Cerutti

Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski

Monsieur le Professeur René Cacan

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Numéro d'ordre :

"Si la nature apparut d'abord à l'homme comme un donné qu'il ne pouvait maîtriser parce qu'il ne pouvait que l'observer à défaut de le comprendre, qui profitait à son corps ou le menaçait, jamais depuis qu'il est homme il ne sut s'en contenter. Toujours, il lui fallut chercher à conserver ou à *modifier* le vivant qui l'entourait, parce que d'abord il lui fallait protéger son corps, sa vie même."

François Gros *in* "l'Ingénierie du vivant", éd. Odile Jacob, 1992.

A la mémoire d'André Verbert.

A Ariane et Lilou,

A ma maman, qui m'a si bien soutenue, encouragée, pour son amour, sa patience et son indulgence extraordinaires,

A Marc et Simone,

A Pierre-Marie.

Je voudrais remercier, à titre posthume, le professeur André Verbert. Il m'a accueillie au laboratoire, mais il a fait plus que ça : il m'a confiée à son ami et complice René Cacan, à qui il a-je crois-soufflé de se mettre aux cellules d'insectes. Il a eu une idée, une drôle d'idée : mettre une *trans*-sialidase dans les cellules d'insectes (allez, chiche qu'on le fait!). Et il m'a confié de réaliser cette idée. Du moins, c'est ce que j'aime à croire. Ce sujet m'a réellement passionnée et m'a emmenée à Saint-Christol, ce qui fut une formidable expérience. Malgré ses fonctions de directeur, il s'est montré extraordinairement attentif et chaleureux à mon égard, sachant me montrer un réel intérêt quand je n'allais pas bien.

Cent fois jusqu'à ce funeste 20 mai j'avais imaginé ma soutenance. J'aurais été tellement fière de lui montrer ce que nous avons fait de son idée... Comme à tous il me manque, et son absence me sera particulièrement pénible ce jour-là.

Je tiens ensuite à exprimer ma très grande gratitude envers le professeur René Cacan, d'abord pour avoir été un directeur attentif mais discret, pour la très grande liberté qu'il m'a laissée et sa disponibilité quand j'en ai eu besoin, et pour ses encouragements. Mais surtout il me faut rendre hommage à la force et à la détermination dont il a fait preuve après la disparition de son ami, pour avoir su tenir le cap et reconforter les membres du groupe. René, je sais qu'il vous a fallu du courage pour poursuivre le travail et contenir notre douleur à tous, pour le bien du laboratoire, et de chacun. Du fond du cœur, merci.

Je tiens à remercier les membres de ce jury :

Professeur Philippe Delannoy,

Merci de ton intérêt dans mon travail, de tes conseils précieux et de ta disponibilité. La disparition d'André m'a poussée à faire souvent appel à toi et tu as su y répondre. Je voulais que tu présides ce jury à sa place, ce n'est pas un rôle facile mais tu l'as accepté volontiers et je t'en suis très reconnaissante.

Docteur Rafael Oriol,

Au cours des réunions du GT-rec, vous m'avez toujours témoigné une grande gentillesse. Vous avez également su me faire profiter de vos conseils et de vos encouragements. C'est pour moi un honneur et un plaisir que vous soyez rapporteur de cette thèse.

Professeur Roland Schauer,

Ich bin froh gewesen, Ihnen ein Paar Mal anlässlich der Glykokonjugierten Studiengruppen in Lille zu treffen, in dieser beid freundlichen und arbeitsamen Stimmung, die zu André so lieb war. Ich habe sehr viel geschätzt, mit dem Hauptfachmann der Sialinsäuren Gespräche zu haben. Mir ist nunmehr eine besondere Ehre, Ihre Zustimmung als Referent dieser Arbeit zu bekommen.

Docteur Marine Cerutti,

Malgré bien d'autres préoccupations tu as su m'accueillir dans ton équipe et me prodiguer les bons conseils. J'ai énormément appris de ce travail dans ton laboratoire. Sans cette aide, le projet *trans*-sialidase n'aurait pu voir le jour. Aujourd'hui tu acceptes de quitter un moment le soleil pour les brumes lilloises et j'en suis très heureuse.

Docteur Jean-Claude Michalski,

Ton intérêt et ton soutien m'ont vraiment aidée à retrouver l'enthousiasme perdu à la mort d'André. Avec tes lourdes fonctions de directeur tu as su m'accorder un peu de ton temps et je t'en suis très reconnaissante. Je te remercie d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Ces pages ne suffiront pas, et j'en oublierai quand même, mais je veux essayer de remercier tous ceux qui ont contribué à ce travail, ou qui ont contribué à me le rendre agréable. Un grand merci donc à tous pour l'accueil, les conseils, la gentillesse, le réconfort, merci pour les sourires, merci de m'avoir supportée...

A Lille :

Anne-Marie, travailler avec toi a été un plaisir. Ta disponibilité, ton humour, et notre complicité me sont très précieux.

Fred, merci d'avoir, entre autres, été notre coach, cela m'a fait le plus grand bien.

François, merci pour les rigolades et les grandes discussions tard le soir et pour ta bonne humeur constante.

Sandrine, c'est toi qui a guidé mes premiers pas au labo, et je t'en remercie.

Au 020, je veux encore remercier Daniel, pour m'avoir initiée aux cellules d'insectes, et Odette, pour m'avoir enseigné les premiers gestes, Lulu, pour ta bonne humeur, et Martin, ça fait longtemps mais je n'ai pas oublié ton précieux coup de main!

Merci encore à Najoua et à Cécile pour leur écoute, à Bénédicte, Anne, Carmen, Yannick, Tony, Yann, Christine, Alexandre, Jérôme et Guy. Merci encore à François Caner pour m'avoir fait goûter à l'enseignement.

Beaucoup de personnes m'ont aidée techniquement :

Merci à toute l'équipe de Jean-Pierre Bohin pour m'avoir si gentiment accueillie quand j'ai eu besoin de bactéries, à Gérard Strecker pour le sialyllactose, à Catherine Alonso, à Jean-Pierre Decottignies, Yves Leroy et Philippe Timermann, et à Joël Mazurier pour sa patience.

Et enfin, merci à Jacqueline et Jeanine, à Fred D. pour les cafés partagés et à Brigitte et Michelle pour les problèmes finalement résolus.

A Saint-Christol :

Merci à vous tous qui m'avez si bien accueillie, faisant mentir l'adage qui dit qu'on a dans le cœur le soleil qu'on n'a pas dans le ciel! Merci surtout à Sylvie pour m'avoir enseigné la bio mol avec autant de gentillesse, et à tous les membres de l'équipe de biologie moléculaire et cellulaire pour les conseils et la bonne humeur. Et pour finir, merci à tous ceux qui ont agrémenté mon séjour au social : Julie, Karine, Magali, Igor, Ahmed, Rémy, et les Québécois, Patrick et Petite Julie.

Tout cela n'aurait pas été possible sans la participation de Madame Martine Cerutti et de Monsieur Gérard Devauchelle, que je remercie sincèrement pour leur intérêt dans mon projet, pour m'avoir permis de venir et pour avoir su répondre à mes nombreuses sollicitations.

A Grenoble :

Merci à Christelle Breton et Anne Imberty pour avoir su répondre à mes questions et surtout un grand merci à Bernard Priem et à Eric Samain pour m'avoir fourni du sialyllactose.

Encore plus loin, à Laramie, WY :

Merci à Don Jarvis de m'avoir aidée et invitée dans le grand ouest américain, à Jason Hollister pour ses cellules et sa gentillesse, et à tous les membres du laboratoire pour leur accueil.

Et finalement,

Merci à maman, à François-Xavier, à la famille Liger, à Ghislaine. Merci à Marc pour l'exemple.

Merci à tous mes amis, en particulier Damien et Barbara pour leur accueil et leur amitié si réconfortante, et pour nos nombreuses soirées tisanes.

Merci à Pierre-Marie pour tout le reste.

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité Mixte de Recherche n°8576 du CNRS, "Glycobiologie Structurale et fonctionnelle", dirigée successivement par le professeur André Verbert puis par le Docteur Jean-Claude Michalski, directeur de recherche à l'INSERM. Il a bénéficié d'une allocation de recherche ministérielle.

Le travail a été encadré principalement par le professeur René Cacan. Il a fait l'objet d'une collaboration avec le Docteur Martine Cerutti, directeur de recherches au CNRS, de la Station de Pathologie Comparée de St Christol Lez Alès, UMR n°5087 INRA / CNRS / Université de Montpellier II, dirigée par le professeur Gérard Devauchelle.

Les travaux présentés ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications :

Marchal, I., Mir, A. M., Kmiecik, D., Verbert, A. & Cacan, R. (1999). Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of N- glycans synthesized by insect cells: a metabolic study with Sf9 cell line. *Glycobiology* **9**(7), 645-54.

Marchal, I., Jarvis, D. L., Cacan, R. & Verbert, A. (2001). Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biol Chem* **382**(2), 151-9.

Marchal, I., Cerutti, M., Mir, A.-M., Juliant, S., Devauchelle, G., Cacan, R and Verbert, A. (2001). Expression of a membrane-bound form of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in baculovirus-infected insect cells: a potential tool for sialylation of glycoproteins produced in the baculovirus-insect cells system. *Glycobiology* **11**(7), 593-603.

Communications orales :

Marchal, I., Mir, A.-M. et Cacan, R. Utilisation d'inhibiteurs pour caractériser des intermédiaires de la maturation des N-glycannes dans les cellules d'insectes.

1^{er} Glycojeune, 31 mars 1999, Villeneuve d'Ascq, France.

Marchal, I., Cerutti, M., Devauchelle, G., Mir, A.-M., Verbert, A. et Cacan, R. Expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in baculovirus-infected insect cells.

12th Joint Meeting, 05-07 novembre 2000, Villeneuve d'Ascq, France.

Marchal, I., Cerutti, M., Mir, A.-M., Devauchelle, G., Verbert, A. et Cacan, R. Engineering sialylation of baculovirus-expressed glycoproteins : expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in insect cells.

27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 30 juin-5 juillet 2001, Lisbonne, Portugal.

Communications par affiche :

Marchal, I., Verbert, A. et Cacan, R. Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of N-glycans synthesized by insect cells : a metabolic study with Sf9 cell line.

11th Joint Meeting, 20-21 novembre 1999, Bonn-Röttgen, Allemagne.

Marchal, I., Juliant, S., Cerutti, M., Devauchelle, G., Verbert, A. et Cacan, R. Expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in baculovirus-infected insect cells.

3rd European colloquium on "Cells as protein factories", 15-17 juin 2000, Paris, France.

Foulquier, F., **Marchal, I.**, Mir, A.-M., Duvet, S., Chirat, F. et Cacan, R. CHO cell lysate display a strong glucosidase activity on glucosylated oligomannoside species.

27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 30 juin-5 juillet 2001, Lisbonne, Portugal.

Abréviations :

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AEP	aminoéthylphosphonate
ARN	acide ribonucléique
Asp	acide aspartique
ATP	adénosine triphosphate
BHK	Baby Hamster Kidney
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMP	cytidine monophosphate
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
FDA	Food and Drug Administration
Fn3	module de type III de fibronectine
Fuc	L-fucose
Gal	D-galactose
GalNAc	D-N-acétylgalactosamine
GDP	guanidine diphosphate
Glc	D-glucose
GlcNAc	D-N-acétylglucosamine
GlcNAc-T ou GNT	D-N-acétylglucosaminyltransférase
Glc-NH ₂	D-glucosamine
Glc-P-Dol	glucosyl phosphodolichol
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GPI	glycosyl-phosphatidylinositol
GV	Granulosis Virus
HBsAg	antigène de surface du virus de l'hépatite B
hGH	human Growth Hormone
HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFN	interféron
IgG	immunoglobuline G

IL	interleukine
Kdn	acide 2-céto-3-désoxynononique
LTR	Long Tandem Repeat
MAA	<i>Maackia amurensis</i> agglutinin
MAG	Myelin Associated Glycoprotein
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
Man	D-mannose
Man-6-P	mannose-6-phosphate
Man-P-Dol	mannosyl phosphodolichol
MNPV	Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus
MOI	multiplicity of infection
4MU-NANA	acide 4'-méthyl-umbelliféryl <i>N</i> -acétylneuraminique
N-CAM	Neuronal Cell Adhesion Molecule
Neu5Ac	acide <i>N</i> -acétylneuraminique
Neu5Gc	acide <i>N</i> -glycolylneuraminique
NPV	Nuclear Polyhedrosis Virus
PDI	peptide disulfide isomérase
pfu	plaque forming unit
p.i.	post-infection
PIPLC	Phosphatidylinositol phospholipase C
PNGase	peptide <i>N</i> -glycanase
RCA	<i>Ricinus communis</i> agglutinin
RE (ER)	reticulum endoplasmique (endoplasmic reticulum)
Ser	L-sérine
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin
Thr	L-thréonine
TS	<i>trans</i> -sialidase
UDP	uridine diphosphate

Introduction bibliographique

I. La production de protéines recombinantes	5
1. Définition.....	5
2. Applications.....	5
3. Les principaux systèmes d'expression	6
3.1. Les qualités d'un système d'expression efficace	6
3.2. Les systèmes procaryotes.....	6
3.3. Les systèmes eucaryotes	7
4. Les protéines recombinantes en thérapie humaine	10
4.1. Avantages des protéines recombinantes sur les protéines naturelles	10
4.2. Quelques exemples.....	11
II. La glycosylation des protéines : application aux glycoprotéines recombinantes.....	12
1. Définition.....	12
2. Structures glycaniques courantes chez l'homme	12
2.1. N-glycosylation.....	12
2.2. O-glycosylation.....	14
2.3. L'ancrage à glycosyl-phosphatidylinositol (GPI).....	16
3. Biosynthèse des glycoprotéines.....	18
3.1. Principe général	18
3.2. La glycosylation dans le reticulum endoplasmique	22
3.3. La glycosylation dans l'appareil de Golgi.....	26
4. Rôles biologiques associés aux oligosaccharides	28
5. Notion de glycosylation terminale	29
6. Les acides sialiques	29
6.1. Définition et structures	29
6.2. Impact des acides sialiques sur les glycoprotéines.....	30
7. La glycosylation des protéines recombinantes thérapeutiques	32
III. Produire des glycoprotéines recombinantes dans le système baculovirus-cellules d'insectes	33
1. Présentation du système	33
1.1. Les cellules de Lépidoptères.....	33
1.2. Les baculovirus.....	33
2. Application à l'expression de gènes étrangers.....	36
2.1. Insertion d'un gène étranger dans le baculovirus.....	36
2.2. Atouts et limites du système pour la production de glycoprotéines recombinantes	37
2.3. Exemples d'applications thérapeutiques.....	38
3. Potentiel de glycosylation des cellules d'insectes.....	38
3.1. N-glycosylation.....	39
3.2. O-glycosylation.....	42
3.3. Autres types de glycosylation	42
3.4. Le problème de la sialylation	44
4. Ingénierie de la glycosylation dans le système baculovirus-cellules d'insectes	46
4.1. Différentes stratégies.....	46
4.2. Etat de l'art	47

IV. La <i>trans</i>-sialidase : une alternative aux sialyltransférases chez certains trypanosomes	48
1. <i>Trypanosoma cruzi</i> et la maladie de Chagas.....	48
2. La <i>trans</i> -sialidase	49
2.1. Découverte de la <i>trans</i> -sialidase.....	49
2.2. Structure de la <i>trans</i> -sialidase.....	50
2.3. Activité catalytique de la <i>trans</i> -sialidase	51
2.4. Fonctions biologiques de la <i>trans</i> -sialidase.....	52
2.5. Applications de l'activité <i>trans</i> -sialidase.....	53

Travaux personnels

Position du travail dans le domaine	56
--	-----------

I. Etude métabolique de la voie de maturation des <i>N</i>-glycannes dans les cellules Sf9	59
---	-----------

1. Introduction.....	59
2. Résultats	60

Article I : Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of *N*-glycans synthesized by insect cells: a metabolic study with Sf9 cell line.

3. Discussion	62
---------------------	----

II. Exemple d'ingénierie de la glycosylation dans les cellules d'insectes : expression d'une galactosyltransférase	66
---	-----------

1. Introduction.....	66
2. Résultats	66
2.1. Structures <i>N</i> -glycanniques synthétisées par les cellules Sfβ4GalT.....	66
2.2. Etude de la galactosylation de surface	69
2.3. Effet de l'infection par un baculovirus	71
3. Discussion	73

III. Une autre voie possible pour sialyler des glycoprotéines dans le système baculovirus-cellules d'insectes : expression d'une <i>trans</i>-sialidase	75
--	-----------

1. Introduction.....	75
2. Résultats	77
2.1. Article II.....	78

Article II : Expression of a membrane-bound form of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase in baculovirus-infected insect cells: a potential tool for sialylation of glycoproteins produced in the baculovirus-insect cells system.

2.2. Efficacité de la sialylation.....	79
3. Discussion	80

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives	84
--	-----------

Appendice technique

I. Cellules et virus	90
1. Cellules.....	90
2. Virus.....	90
II. Marquages métaboliques et analyse des oligosaccharides.....	91
1. Marquages métaboliques	91
1.1. Le milieu de marquage.....	91
1.2. Marquage métabolique au 2-[³ H]Man.....	91
2. Préparation des oligosaccharides	91
2.1. Lyse des cellules en vue de l'extraction	91
2.2. Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques.....	91
2.3. Préparation d'oligosaccharides à partir des glycoprotéines	93
3. Analyse des oligosaccharides	93
3.1. Analyse par HPLC.....	93
3.2. HPLC préparative.....	93
3.3. Digestions par des exoglycosidases spécifiques.....	93
III. Cytofluorimétrie de flux	94
IV. Analyse de la composition en monosaccharides de l'orosomucoïde	94
1. Préparation des échantillons	94
1.1. Orosomucoïde désialylé.....	94
1.2. Orosomucoïde resialylé.....	94
2. Méthanolyse et dérivation.....	95
2.1. Méthanolyse.....	95
2.2. Acylation.....	95
3. Chromatographie en phase gazeuse.....	95

Annexe

Revue : Glycoproteins from insect cells : sialylated or not?

Références bibliographiques

Introduction
bibliographique

I. La production de protéines recombinantes

Issue des techniques du génie génétique, dont les premiers jalons ont été posés par Cohen *et al.* en 1973, la production de protéines recombinantes est un élément essentiel des biotechnologies actuelles. Elles ont envahi la bioindustrie et représentent un vaste réservoir de nouveaux médicaments potentiels.

1. Définition

Une protéine recombinante résulte de l'expression par un organisme ou une cellule hôte d'un ADN étranger. La protéine, synthétisée par une cellule différente de sa cellule d'origine, est aussi dite hétérologue. Un système efficace de production de protéines recombinantes s'appuie sur : (i) un gène ou un ADN complémentaire codant la protéine d'intérêt, qualifié d'insert, (ii) un vecteur d'expression transportant le gène d'intérêt, et (iii) une cellule hôte qui exécute les instructions fournies par l'insert pour synthétiser la protéine.

2. Applications

L'expression d'une protéine recombinante peut être une nécessité pour établir la fonction d'un gène. Il existe divers systèmes d'expression voués à optimiser la production et la purification des protéines recombinantes. Au niveau industriel, des centaines de protéines recombinantes peuvent être fabriquées pour cribler de nouveaux médicaments, selon le postulat que les cibles pour la thérapie sont, pour une grande majorité, des protéines. Ces méthodes peuvent être automatisées pour le criblage à haut débit. Le séquençage du génome humain publié en février 2001 (*Nature*, **409**, n°6822 ; *Science*, **291**, n°5507) devrait, entre autres, multiplier les cibles potentielles à explorer.

En outre, les protéines recombinantes peuvent aussi constituer un produit industriel à haute valeur ajoutée :

- ☆ De nombreuses enzymes sont ainsi produites pour des secteurs industriels aussi différents que ceux de la pharmacie, de l'agro-alimentaire, du textile, de la tannerie, du papier, et des détergents. Ces outils moléculaires ont constitué, il y a une vingtaine d'années, une petite révolution : non polluants, biodégradables, ils consomment nettement moins de réactifs toxiques et coûteux et produisent beaucoup moins de déchets que les réactifs chimiques classiques.

- ☆ Grâce à leur spécificité très fine, les protéines recombinantes peuvent constituer de puissants réactifs diagnostics.
- ☆ Enfin, des protéines recombinantes peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques, constituant une nouvelle génération de produits dits biopharmaceutiques extrêmement précis et prometteurs.

3. Les principaux systèmes d'expression

3.1. Les qualités d'un système d'expression efficace

Le système idéal doit permettre une production abondante à des coûts raisonnables. Pour cela, les cellules hôtes doivent se prêter à la culture à densité élevée en fermenteurs, être résistantes et peu exigeantes en milieux nutritifs.

Il faut ensuite s'assurer que la protéine soit correctement synthétisée et repliée, que les bons ponts disulfures soient établis, qu'elle ne subisse pas de protéolyse inopportune, et que les modifications post-traductionnelles soient réalisées : en somme, il faut que la molécule recombinante soit semblable voire identique à la protéine native. La question encore délicate de la glycosylation, cruciale pour les applications thérapeutiques, sera discutée dans le deuxième chapitre de cet exposé.

Enfin, la purification est un point essentiel : elle doit être simple, rapide et garantir le maintien de toutes les propriétés physico-chimiques et biologiques de la protéine. Les capacités de sécrétion des cellules hôtes sont un critère déterminant. Sur le plan sanitaire, il faut se débarrasser des toxines éventuellement contenues dans les milieux de culture et surveiller les risques de contaminations virale ou bactérienne ou encore la présence de prions.

3.2. Les systèmes procaryotes

La bactérie *Escherichia coli* fut et reste le premier hôte utilisé pour la fabrication de protéines recombinantes (Dodet, 1990). Ses avantages incontestables sont une génétique parfaitement connue, une culture relativement simple et peu coûteuse, et des taux d'expression très élevés, de l'ordre de plusieurs grammes de protéine par litre pour des cultures de masse en fermenteurs. Un grand nombre de vecteurs plasmidiques sont disponibles pour faciliter l'insertion de gènes étrangers et la sélection des recombinants, contrôler très précisément l'expression, et purifier la protéine produite.

L'un des principaux inconvénients d'*E. coli* est qu'elle sécrète mal les protéines. D'autres hôtes procaryotes suscitent l'intérêt des industriels, notamment *Bacillus subtilis* et le genre *Streptomyces*, qui présentent de meilleures propriétés de sécrétion qu'*E. coli*. Néanmoins, grâce aux progrès dans la connaissance de ses mécanismes de sécrétion, de nouveaux vecteurs permettant un adressage spécifique des protéines recombinantes dans les différents compartiments cellulaires sont apparus (Pines et Inouye, 1999 et Cornelis, 2000).

Pourtant, les procaryotes ne constituent pas le système idéal pour la production de protéines recombinantes car ils ne sont pas capables de réaliser les modifications post-traductionnelles de type eucaryote. Ceci peut avoir des conséquences essentielles sur la conformation, l'activité biologique ou encore l'antigénicité de la protéine. *E. coli* reste donc un système de choix pour des molécules simples, mais son utilisation est exclue pour des protéines plus complexes. Parmi les protéines eucaryotes produites avec succès en système procaryote, l'insuline, première protéine recombinante utilisée en thérapie humaine, a été commercialisée depuis 1982 sous forme injectable.

3.3. Les systèmes eucaryotes

3.3.1. Les levures et les champignons filamenteux

Ces eucaryotes présentent à la fois l'avantage de se multiplier rapidement et de pousser sur des milieux simples, et l'aptitude à réaliser un grand nombre de modifications post-traductionnelles connues telles que la carboxylation, l'acylation, la phosphorylation et la glycosylation, celle-ci différant toutefois substantiellement de celle des mammifères.

Parmi les levures, la mieux connue est la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*. Les taux d'expression de protéines hétérologues peuvent atteindre plusieurs centaines de milligrammes par litre de culture. Par contre, les protéines restent souvent cytoplasmiques, ce qui nécessite leur extraction après la lyse des cellules. Là encore, la sécrétion et la maturation peuvent être améliorées par adjonction de signaux spécifiques (Eckart et Bussineau, 1996). D'autres organismes semblent être de bons candidats pour la production de protéines recombinantes, étant meilleurs sécréteurs. C'est le cas de *Pichia pastoris*, une autre levure qui a la particularité de pousser sur du méthanol, très économique, et est capable de convertir 30 à 40% de son poids en protéines (Dodet, 1990). De grandes quantités de protéine d'intérêt, de l'ordre de

quelques grammes par litre, peuvent être obtenus. Le système levure convient tout à fait à la production industrielle d'enzymes parfaitement actives (Malissard *et al.*, 1999).

Les champignons filamenteux de la famille des *Aspergillus* sont également utilisés pour la production de quelques enzymes industrielles. Bons sécréteurs, ils réalisent des modifications post-traductionnelles plus proches de celles des cellules animales que ne le font les levures. Les taux de production sont très variables d'une protéine à l'autre, mais atteignent dans certains cas des taux considérables (plusieurs dizaines de grammes par litres) (Maras *et al.*, 1999).

3.3.2. Les plantes transgéniques

L'insertion d'un gène étranger dans une plante est rendue possible grâce à la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie est capable de provoquer des tumeurs chez certaines plantes comme le tabac ou le maïs, grâce à un plasmide particulier, dit "tumor inducing" (Ti), capable de s'introduire dans une cellule infestée et de s'intégrer de façon stable à un chromosome. Cette propriété a été mise à profit pour transformer les cellules végétales avec des plasmides recombinants contenant les séquences d'intérêt. Les plantes transgéniques générées à partir de ces cellules transformées représentent une source considérable et très bon marché de protéines, avec peu de risques de contaminations virales ou bactériennes (pour revue, voir Giddings *et al.*, 2000). La sécrétion des protéines par les cellules végétales conduit à leur accumulation dans l'espace extra-cellulaire, où elles restent prisonnières de la paroi et sont donc difficiles à purifier. C'est pourquoi les protéines recombinantes sont le plus souvent adressées grâce à des signaux spécifiques vers la vacuole ou le reticulum endoplasmique, dont l'environnement garantit une meilleure stabilité. En outre, la purification des protéines à partir de ces compartiments est plus simple. Ce système semble néanmoins très prometteur pour la fabrication à faible coût de vaccins administrés par voie alimentaire, particulièrement adaptés aux besoins des pays en voie de développement (Walmsley et Arntzen, 2000).

3.3.3. Les cellules animales

Les principaux systèmes sont des cellules de mammifères ou d'insectes (pour revue, voir Geisse et Kocher, 1999, et Geisse *et al.*, 1996), ou des mammifères transgéniques.

a. Les cellules de mammifères

Il existe une pléthore d'hôtes mammifères utilisés pour la production de protéines recombinantes. Le choix dépend de l'utilisation prévue, des quantités recherchées et de la nécessité ou non d'une expression continue.

Les cellules les plus largement utilisées sont les cellules d'ovaire de hamster chinois, CHO (Chinese Hamster Ovary), et les cellules de rein de hamster nouveau-né, BHK (Baby Hamster Kidney). Ces cellules peuvent subir des transfections stables, grâce à une pression de sélection. Les lignées cellulaires ainsi obtenues produisent en continu et de façon constante les protéines d'intérêt. En outre, elles peuvent être cultivées en fermenteurs et sans sérum. Les protéines recombinantes sont très semblables aux molécules natives, ce qui en fait le système préféré à l'heure actuelle pour la fabrication de protéines pour la thérapie humaine, malgré des taux d'expression assez faibles et une culture délicate et coûteuse. Néanmoins, leur physiologie est très bien connue et l'optimisation des rendements fait l'objet de nombreuses études. Parallèlement au développement de vecteurs toujours plus puissants, il est notamment possible de travailler sur le contrôle de la prolifération et de l'apoptose pour augmenter la productivité et améliorer la qualité des protéines synthétisées (Fussenegger *et al.*, 1999), ou sur le contrôle de l'expression de gènes endogènes (Warner, 1999). D'autres lignées cellulaires sont couramment utilisées en laboratoire pour l'expression transitoire, en particulier les cellules COS, de rein de singe vert.

Une autre application possible est l'expression de protéines recombinantes chez des animaux transgéniques entiers, notamment dans la glande mammaire. Ces animaux sont obtenus par microinjection du gène étranger dans le pronucleus de l'œuf fécondé, qui est ensuite réimplanté dans l'utérus d'une femelle. La technique est surtout appliquée pour des souris, dont l'élevage est peu coûteux, mais peut l'être pour d'autres animaux, notamment des chèvres ou des brebis. Les protéines obtenues sont faciles à purifier, parfaitement maturées et en quantités satisfaisantes. Une dizaine de brebis transgéniques suffiraient à satisfaire la demande mondiale en facteur IX (Gros, 1992). Néanmoins, ce système se heurte toujours à des problèmes d'éthique.

b. Les cellules d'insectes

Le système baculovirus-cellules d'insectes, l'un des plus populaires pour l'expression de protéines recombinantes d'origine eucaryote, s'appuie sur l'insertion du ou des gènes à exprimer dans le génome d'un baculovirus vecteur, et sur l'infection de cellules en culture ou de larves de

Lépidoptères par le virus recombinant (pour revue, voir Miller, 1988 ; Fraser, 1992 ; Devauchelle et Cerutti, 1993 et 1999 ; Jarvis, 1997 et Possee, 1997). Le système a l'inconvénient d'être lytique et donc transitoire, mais ses atouts sont les très hauts niveaux d'expression et les relatives rapidité et facilité avec lesquelles les recombinants sont obtenus. Ce système fera l'objet du chapitre III.

4. Les protéines recombinantes en thérapie humaine

En 2000, une soixantaine de protéines recombinantes étaient répertoriées sur le marché pharmaceutique (Walsh, 2000), mais des centaines d'autres molécules sont en cours d'évaluation. 60 millions de patients à travers le monde ont déjà bénéficié de ces nouveaux produits, dont le précurseur fut l'insuline commercialisée en 1982 par la société Eli Lilly sous le nom d'humuline.

4.1. Avantages des protéines recombinantes sur les protéines naturelles

La technologie de l'ADN recombinant a un impact triple sur la production de protéines thérapeutiques. Tout d'abord, il a permis de contourner les problèmes liés à l'approvisionnement à partir d'une source naturelle, souvent insuffisant en termes de quantités mais aussi compliqué dans certains cas par une extraction difficile ou même dangereuse comme le venin de vipère, source d'un anticoagulant dont la version recombinante est aujourd'hui en cours d'évaluation.

D'autre part, les techniques d'ingénierie des protéines ont permis aux sociétés pharmaceutiques d'introduire des modifications dans la séquence peptidique afin d'augmenter l'efficacité ou la rapidité d'action des protéines recombinantes. On peut ainsi tailler sur mesure une protéine pour modifier l'une de ses propriétés en se basant sur des techniques de modélisation, ou même générer de nouvelles protéines de fusion.

Enfin, une considération d'importance grandissante concerne la sécurité liée aux produits recombinants par rapport à la source naturelle. L'exemple le plus frappant reste celui de l'hormone de croissance humaine (hGH) extraite jusqu'en 1985 de glandes pituitaires de cadavres. La découverte d'un lien entre ce traitement et la maladie de Creutzfeld-Jacob a mis fin à cet approvisionnement et a profité à la société Genentech qui commercialisait la première hormone de croissance humaine recombinante (Walsh, 2000).

Néanmoins, des risques de contaminations par des virus, de l'ADN ou des protéines existent pour les protéines d'extraction comme pour les protéines recombinantes. Les exigences

de pureté et de sécurité sont par conséquent équivalentes pour les deux types de protéines thérapeutiques (Faure *et al.*, 1991 et Dodet, 1992).

4.2. Quelques exemples

Les protéines recombinantes utilisées en thérapie humaine sont des hormones, des facteurs sanguins, des facteurs de croissance hématopoïétiques, des interférons et interleukines, et des vaccins.

Il faut noter qu'un nombre limité d'hôtes, ceux dont la biologie est la mieux caractérisée, sont aujourd'hui agréés pour la production de protéines recombinantes à visée thérapeutique.

Tableau I : Quelques exemples de protéines recombinantes thérapeutiques commercialisées, d'après Walsh (2000).

Catégorie	Protéine*	Système de production	Nom commercial	Société
hormones	rhGH	<i>E. coli</i>	Humatrope	Eli Lilly
	rhGH modifiée	<i>E. coli</i>	Protropin	Genentech
	Glucagon	<i>S. cerevisiae</i>	Glucagen	Novo Nordisk
Facteurs sanguins	Facteur IX	CHO	Benefix	Genetics Institute
	Facteur VIII	BHK	Kogenate	Bayer
Facteurs de croissance hématopoïétiques	Erythropoïétine	CHO	Neorecormon	Boehringer-Mannheim
	GM-CSF modifié	<i>E. coli</i>	Leukine	Immunex
Interférons, interleukines	IFN- α 2b	<i>E. coli</i>	Alfatronol	Schering Plough
	IL-2 modifiée	<i>E. coli</i>	Proleukin	Chiron
Vaccins	HBsAg (hépatite B)	<i>S. cerevisiae</i>	Merck	Recombivax

*Toutes les protéines citées sont des protéines recombinantes d'origine humaine. Les protéines modifiées résultent d'une modification du gène humain.

Abréviations : rhGH, hormone de croissance humaine recombinante ; GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor ; IFN : interféron, IL : interleukine ; HBsAg : antigène de surface du virus de l'hépatite B.

II. La glycosylation des protéines : application aux glycoprotéines recombinantes

1. Définition

La structure primaire de la chaîne polypeptidique ne dépend que de celle de l'ADN complémentaire, et est donc parfaitement contrôlable, car le code génétique est universel. Mais la plupart des protéines subissent, au cours de leur synthèse et de leur maturation, des modifications dites co- ou post-traductionnelles. Ces modifications dépendent de la protéine et de l'équipement enzymatique de la cellule hôte. La glycosylation, qui est en fait un terme générique pour désigner différentes réactions d'addition covalente de chaînes d'oligosaccharides ou oligosides sur un squelette peptidique (ou sur un lipide), est probablement la plus importante chez les eucaryotes, elle est aussi l'une des plus complexes. D'après Hanisch (2001), plus de la moitié des protéines répertoriées dans les bases de données seraient des glycoprotéines.

2. Structures glycaniques courantes chez l'homme

2.1. N-glycosylation

C'est la mieux connue et la plus répandue des formes de glycosylation. Les *N*-glycannes sont toujours liés à un résidu d'asparagine au sein d'une séquence particulière aussi appelée *séquan* de formule Asn-X-Thr/Ser, X désignant n'importe quel acide aminé autre que la proline. La présence d'un acide aminé hydroxylé en position n+2 est absolument requise (Figure 1). Par contre, tous les sites potentiels de *N*-glycosylation ne sont pas nécessairement substitués. D'autres signaux dans la chaîne protéique ou, plus vraisemblablement, le repliement de la protéine et donc l'accessibilité des enzymes semblent jouer un rôle dans l'occupation des sites de glycosylation. En outre, tous les séquons ne sont pas occupés avec la même efficacité.

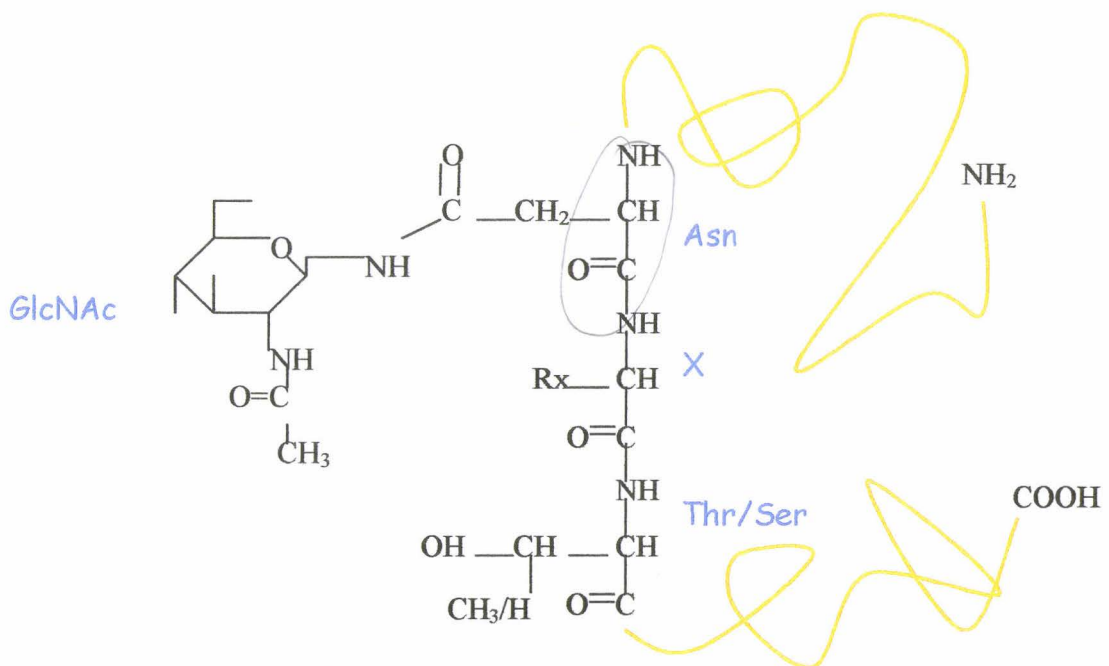
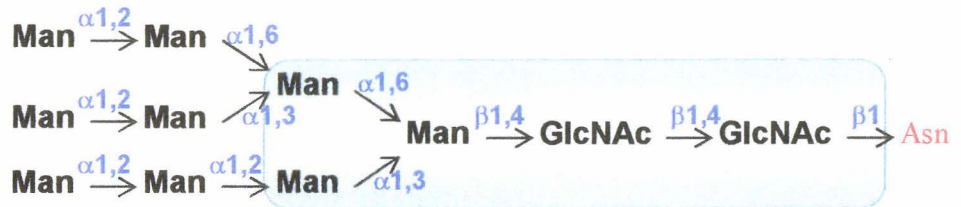


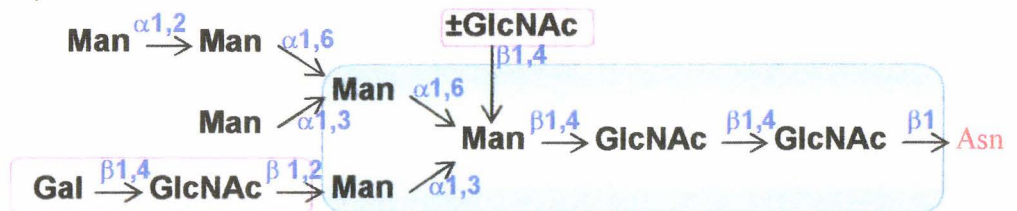
Figure 1 : liaison GlcNAc β 1Asn

Classiquement, trois types de structures sont décrites chez les mammifères (Kornfeld et Kornfeld, 1985) : le type oligomannosidique, le type hybride et le type complexe, dont les modèles sont représentés figure 2. En réalité, un grand nombre de variations existent au sein de ces trois classes. Il est remarquable que ces différentes structures sont en fait toutes constituées d'un noyau identique, souvent appelé *core*, et diffèrent par les extrémités non réductrices. Les glycannes de type oligomannosidique portent sur ce noyau des chaînes de mannose, alors que les glycannes de type complexe présentent des *antennes* plus ou moins longues constituées d'une ou plusieurs unité(s) *N*-acétyllactosaminiques (Gal β 1,4GlcNAc), terminées par des *sucres périphériques*, notamment des résidus d'acides sialiques, de fucose ou de galactose lié en α . Il peut exister jusqu'à 5 antennes. Il est à noter que le fucose, quand il est branché sur le noyau, est aussi considéré comme un sucre périphérique. Les glycannes sont dits de type hybride quand l'une des branches est oligomannosidique et l'autre de type complexe.

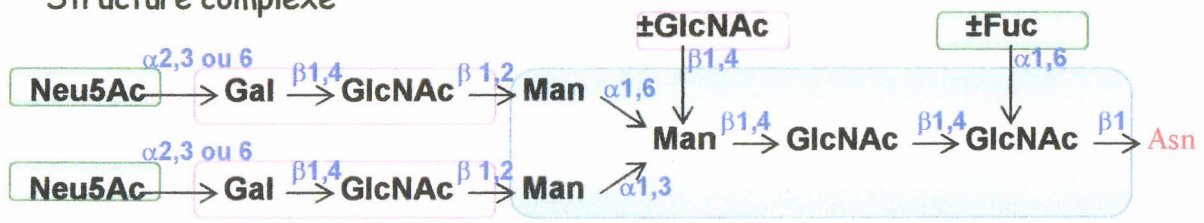
Structure oligomannosidique



Structure hybride



Structure complexe



- noyaux
- antennes
- sucres périphériques

Figure 2 : Structures des trois grandes familles de N-glycannes

2.2. O-glycosylation

L'autre forme majeure de glycosylation est la O-glycosylation, pour laquelle la liaison sucre-protéine se fait *via* un acide aminé hydroxylé. En réalité, différents types de O-glycosylation sont connus (et l'inventaire n'est probablement pas terminé) mais certains sont limités à des espèces, des tissus ou des polypeptides particuliers. Pour revue, voir Hanisch (2001). La plus fréquente de ces modifications est la O-glycosylation dite de type mucine, qui est répandue dans tout le règne animal et dont l'existence a récemment été démontrée chez les

plantes (Kishimoto *et al.*, 1999). La liaison se fait entre l'hydroxyle anomérique d'un résidu de α -*N*-acétylgalactosamine et l'hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine de la protéine. Les mucines qui ont donné leur nom à cette forme de glycosylation possèdent des segments peptidiques riches en sérine et thréonine sur lesquels sont rassemblés de très nombreux oligosaccharides, mais les mêmes sucres existent de façon isolée sur bon nombre de glycoprotéines sécrétées ou membranaires.

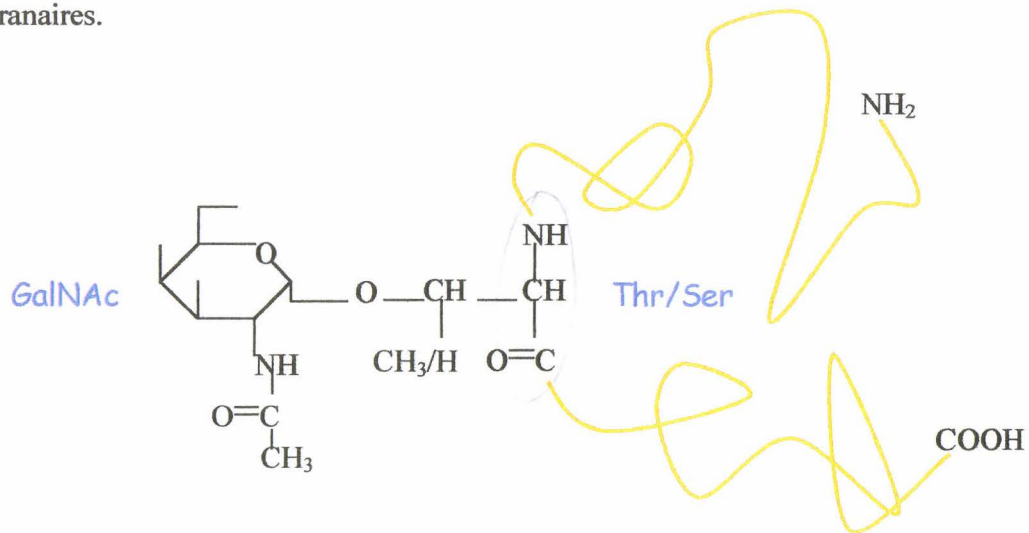


Figure 3 : Liaison GalNAc α 1Ser/Thr

Les *O*-glycannes sont formés de trois régions : le noyau, le squelette et la périphérie. La combinaison de ces éléments, schématisés figure 4, aboutit à une quasi-infinité de structures : il existe au moins 8 noyaux différents et deux types de squelettes, qui peuvent être linéaires ou ramifiés, et de longueurs très variées. Quant à la région périphérique, elle peut être le siège d'antigènes de groupes sanguins. Notons que les sucres périphériques peuvent aussi être portés directement par les noyaux.

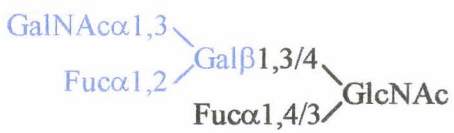
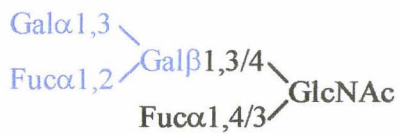
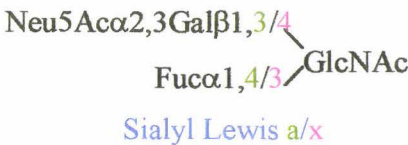
Périphérie	Squelette	Noyau	type
 Antigène A	Galβ1,3GlcNAcβ1,3 Type 1	^T Galβ1,3GalNAc GlcNAcβ1,6-GalNAc ^{Tn} Galβ1,3	1 2
 Antigène B	Galβ1,4GlcNAcβ1,3 Type 2	GlcNAcβ1,3GalNAc	3
 Sialyl Lewis a/x	Galβ1,4GlcNAcβ1,6-Gal Galβ1,4GlcNAcβ1,3 Branchement	GalNAcα1,3GalNAc GlcNAcβ1,6GalNAc GalNAcα1,6GalNAc Galα1,3GalNAc	4 5 6 7 8

Figure 4 : Exemples d'éléments structuraux des O-glycannes de type mucine (d'après Hanisch, 2001)

Les noyaux ou *cores* de types 1 et 2 sont les plus fréquents, le *core* 1 est aussi appelé antigène T, tandis qu'un simple résidu de *N*-acétylgalactosamine non substitué est désigné antigène Tn.

2.3. L'ancrage à glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)

L'ancrage GPI combine une protéine, un oligosaccharide et un lipide, le phosphatidylinositol, ce qui permet la liaison de la protéine à une membrane *via* la partie lipidique (figure 5). Ces structures sont très répandues chez de nombreux protozoaires, mais se rencontrent aussi chez les eucaryotes supérieurs (pour revue, voir Ferguson et Williams, 1988, et Ferguson, 1999).

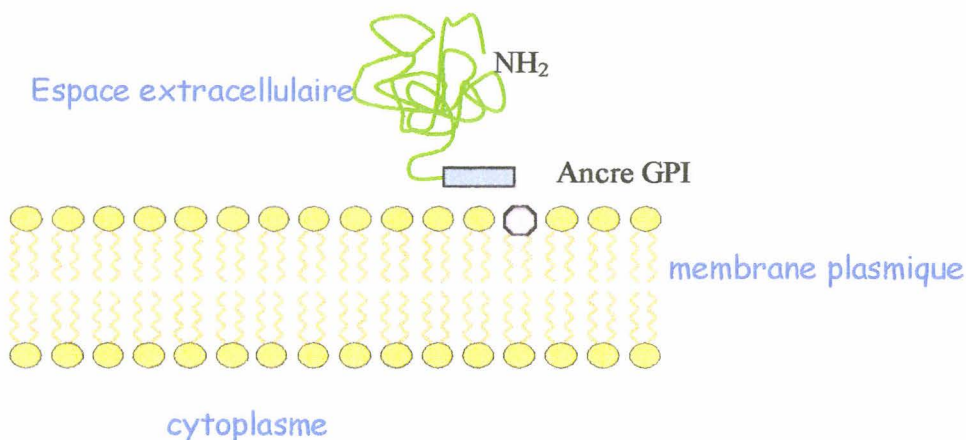


Figure 5 : Représentation schématique d'une protéine liée à la membrane plasmique par un ancrage GPI

Autour d'un noyau commun (figure 6, en bleu) comprenant une phosphoéthanolamine, trois résidus de mannose et un résidu de glucosamine, on rencontre divers substituants, y compris des chaînes lipidiques supplémentaires, variables selon les espèces ou les tissus. Ce noyau est lié à un acide phosphatidique par l'intermédiaire d'un myo-inositol. Certaines protéines liées à la membrane *via* un GPI pourraient être libérées dans le milieu par l'action d'une phospholipase spécifique. Ce type d'ancrage membranaire permet ainsi à de nombreux parasites d'éliminer rapidement leurs antigènes de surface et d'échapper au système immunitaire.

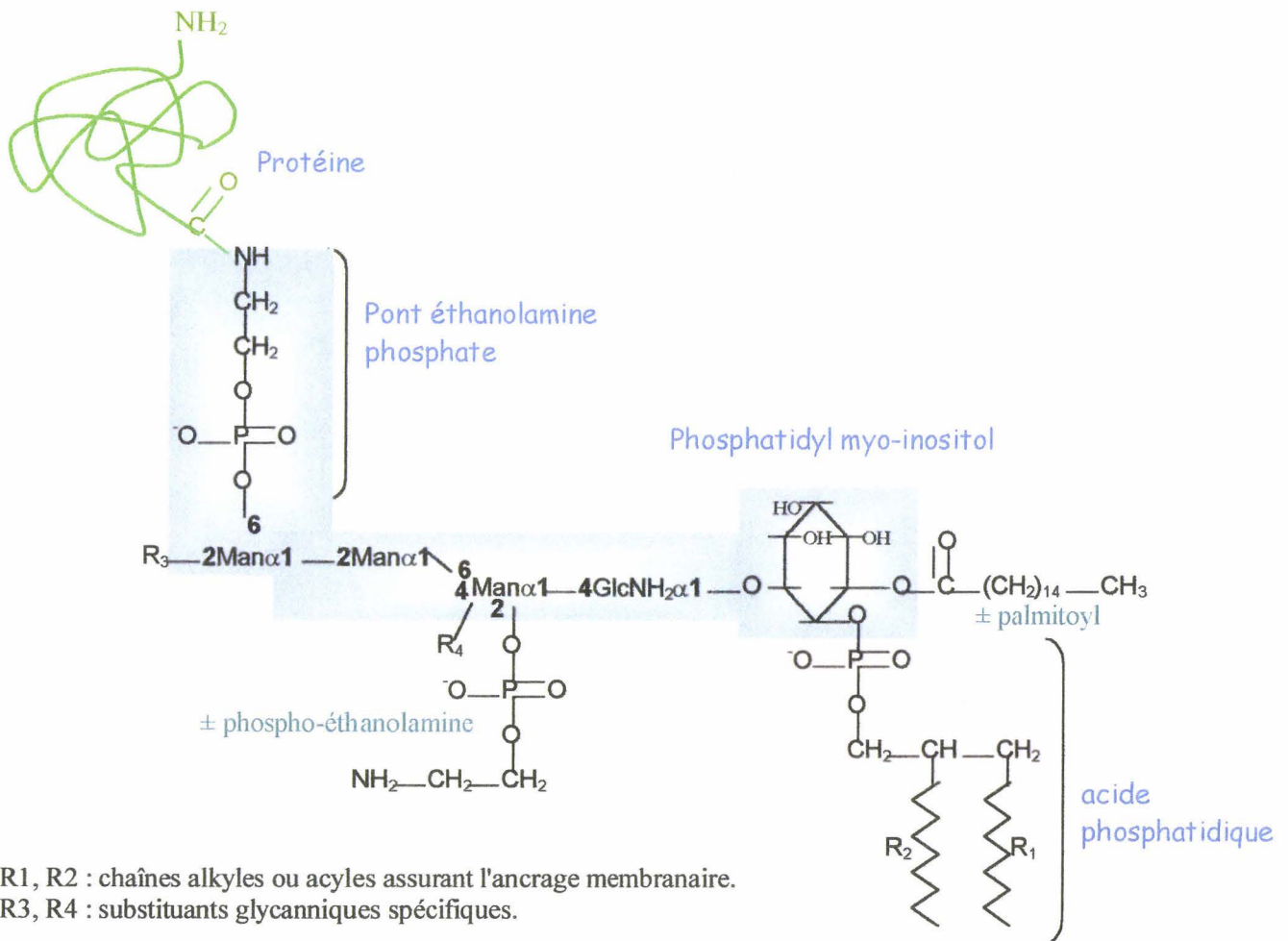


Figure 6 : Structure chimique d'une ancre GPI

3. Biosynthèse des glycoprotéines

L'objet de ce chapitre n'est pas de détailler toutes les étapes qui mènent à la formation des différentes structures glycaniques (pour revue, se référer à Kornfeld et Kornfeld, 1985 pour les *N*-glycoprotéines et à Brockhausen, 1995 pour les *O*-glycoprotéines), mais plutôt de dégager quelques idées nécessaires à la compréhension de ces mécanismes et à toute stratégie d'ingénierie de la glycosylation.

3.1. Principe général

A la différence des acides nucléiques et des protéines, les glycanes ne sont pas synthétisés selon un modèle mais résultent de l'action d'un grand nombre d'enzymes, elles-mêmes produits de gènes. Une autre caractéristique fondamentale, qui rend leur étude beaucoup plus complexe que celle des autres classes de macromolécules, est leur structure non-linéaire, qui

autorise une immense diversité de motifs (Sharon, 1975) puisque plusieurs liaisons sont possibles entre deux monosaccharides. Le tableau II illustre la diversité de structures linéaires pouvant être formées avec un nombre réduit de monomères différents, mais les ramifications possibles multiplient encore le nombre de combinaisons. Il n'existe donc pas un schéma simple de biosynthèse, mais c'est la conjonction d'une multitude de facteurs qui détermine les structures produites. Une autre conséquence est qu'on ne trouve pas une structure unique associée à un site de glycosylation mais un répertoire de structures, à l'origine de la microhétérogénéité.

Tableau II : Nombre d'oligomères linéaires théoriquement possibles avec n monomères différents (d'après Kobata).

n	ADN	Protéines	Oligosaccharides*	
1	4	20	4	8
2	16	400	128	800
3	64	8000	4096	$6,40 \times 10^4$
10	$1,04 \times 10^6$	$1,28 \times 10^{13}$	$1,40 \times 10^{14}$	$1,34 \times 10^{18}$

* exemples avec 4 ou 8 types de monosaccharides

3.1.1. Localisation

A l'exception des protéines à *O*-*N*-acétylglucosamine où des résidus sérinyl ou thréoninyl sont modifiés par de la *N*-acétylglucosamine non substituée (Wells *et al.*, 2001), et qui sont essentiellement nucléaires ou cytosoliques, l'assemblage des glycoprotéines est toujours réalisé dans les compartiments du reticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi (Hirschberg et Snider, 1987). Les protéines concernées sont donc en majorité sécrétées, membranaires ou résidentes de ces compartiments, ce qui implique qu'elles possèdent toutes une séquence signal gouvernant leur translocation vers le reticulum endoplasmique granulaire.

3.1.2. Les précurseurs

Pour être transféré sur une glycoprotéine, un monosaccharide doit d'abord être sous forme activée, c'est-à-dire sous forme de nucléotide-sucre. La très grande majorité des glycosyltransférases utilise ces molécules comme donneurs exclusifs. Seules, des enzymes du reticulum endoplasmique granulaire ont pour substrat un monosaccharide lié à un lipide : le mannosyl phosphodolichol (Man-P-Dol) ou le glucosyl phosphodolichol (Glc-P-Dol), eux-mêmes formés respectivement à partir du GDP-mannose et de l'UDP-glucose.

Les formes activées des différents monosaccharides intervenant dans la biosynthèse des glycoprotéines et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau III. Remarquons que seul l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) est lié à un nucléotide monophosphate (Kean, 1991), chacun des autres oses étant lié à un nucléotide diphosphate.

Tableau III : *Formes activées des principaux monosaccharides rencontrés dans les glycoprotéines*

Monosaccharide	Forme activée	abréviation	anomérie
Glc	Uridine diphospho-glucose	UDP-Glc	α
Gal	Uridine diphospho-galactose	UDP-Gal	α
GlcNAc	Uridine diphospho- <i>N</i> -acétylglucosamine	UDP-GlcNAc	α
GalNAc	Uridine diphospho- <i>N</i> -acétylgalactosamine	UDP-GalNAc	α
Man	Guanosine diphosphomannose	GDP-Man	α
Fuc	Guanosine diphosphofucose	GDP-Fuc	β
Neu5Ac	Cytidine monophosphate-acide <i>N</i> -acétylneuraminique	CMP-Neu5Ac	β

Exception faite du CMP-Neu5Ac qui est synthétisé dans le noyau puis transporté dans le cytosol (Münster *et al.*, 1998), tous les nucléotides-sucres sont synthétisés dans le cytosol, alors que les réactions de glycosylation ont lieu dans les compartiments réticulaires et golgiens (Hirschberg et Snider, 1987). L'utilisation des donneurs dans la lumière de ces compartiments est permise par la mise en œuvre de deux systèmes distincts :

- ☆ Dans le reticulum endoplasmique, les intermédiaires Man-P-Dol et Glc-P-Dol sont formés côté cytosol à partir du GDP-Man et de l'UDP-Glc puis subissent un retournement (un *flip-flop*) vers le compartiment luminal.
- ☆ Dans l'appareil de Golgi, les nucléotides-sucres sont pris en charge par des transporteurs spécifiques. Il existe aussi des transporteurs d'UDP-GlcNAc et d'UDP-Glc vers le reticulum endoplasmique, mais pas de GDP-Man.

3.1.3. Les glycosyltransférases

Ce sont les enzymes clés de toutes les réactions de glycosylation (pour revue, voir Kleene et Berger, 1993). Les glycosyltransférases intervenant dans la biosynthèse des glycoconjugués

chez les eucaryotes sont des protéines membranaires de type II, présentant un court domaine N-terminal cytoplasmique, un segment transmembranaire hydrophobe et un domaine C-terminal luminal, de forme globulaire, portant l'activité catalytique. Entre le domaine transmembranaire et la région catalytique, une région tige, encore appelée peptide de liaison ou *stem*, fait fonction d'espaceur (figure 7) et est accessible à des protéases spécifiques qui génèrent des formes solubles.

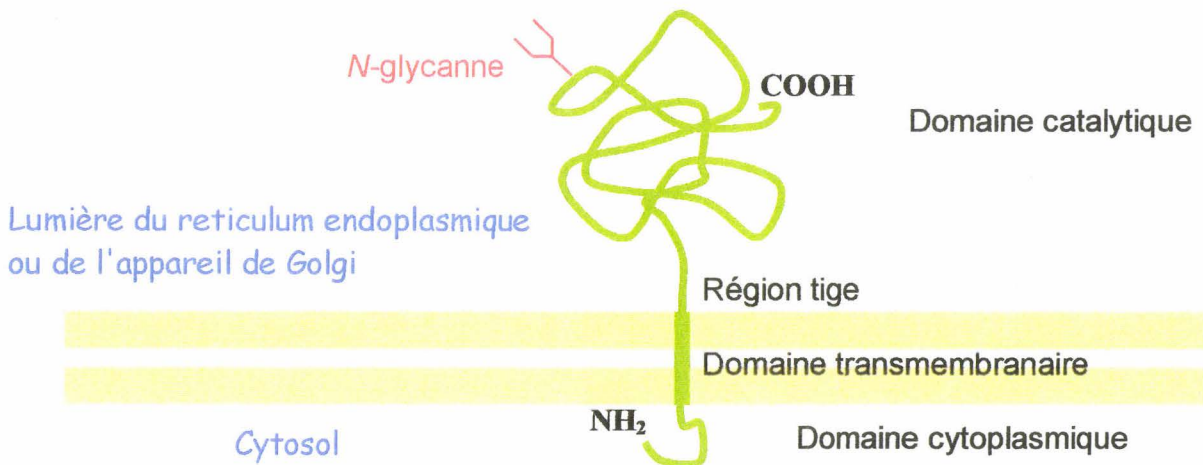


Figure 7 : Représentation schématique d'une glycosyltransférase

Dans la plupart des cas, les glycosyltransférases ont une spécificité très fine pour leur accepteur. Un exemple est donné par la β 1,4-galactosyltransférase (Blanken *et al.*, 1984) qui agit sur toutes les antennes des *N*-glycannes de type complexe, mais à des vitesses très différentes. De plus, elles ont une localisation très spécifique dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (Colley, 1997), grâce à des signaux de rétention dont certains ont été localisés. Ces éléments sont déterminants pour la séquence en monosaccharides. Enfin, si certaines transférases sont ubiquistes, d'autres ne sont présentes que chez des espèces, dans des tissus ou à des moments donnés du développement, ou encore dans des états physiologiques particuliers, où elles permettent la synthèse de structures glycaniques spécifiques (van den Eijnden, 2000).

De manière générale, notons que plus les glycosyltransférases sont impliquées dans le transfert des sucres terminaux, plus elles sont spécifiques de l'organisme, du tissu, de la cellule et même de son état de différenciation.

3.2. La glycosylation dans le reticulum endoplasmique

Les premières étapes de la *N*-glycosylation et de la synthèse des ancrages GPI se déroulent dans le reticulum endoplasmique granulaire, parallèlement à la ségrégation de la chaîne protéique naissante dans la lumière. Elles mettent en jeu des intermédiaires lipidiques.

3.2.1. Biosynthèse des *N*-glycannes

Un oligosaccharide de structure $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, (figure 8) commun à tous les eucaryotes, est assemblé sur une molécule de dolichol *via* une liaison pyrophosphate, avant d'être transféré en bloc sur une protéine en cours d'élongation (pour revue, voir Kornfeld et Kornfeld, 1985). Le cycle des dolichols qui aboutit à ce précurseur tétradécasaccharidique a été largement étudié (Abeijon et Hirschberg, 1992), il est résumé dans la figure 9. La première étape est la formation du dolicholpyrophospho-*N*-acétylglucosamine par une *N*-acétylglucosaminyl-1-phosphotransférase, et peut être inhibée par la tunicamycine. Le transfert sur la protéine est catalysé par un complexe enzymatique supramoléculaire, l'oligosaccharyltransférase. Ce complexe est capable, quand les accepteurs protéiques manquent, de transférer l'oligosaccharide sur de l'eau, générant des oligosaccharides solubles qui ont un système spécifique de transport vers le cytosol (Verbert et Cacan, 1999). Ce processus participe au contrôle du cycle des dolichols et évite l'accumulation de précurseurs inutilisés dans le reticulum endoplasmique.

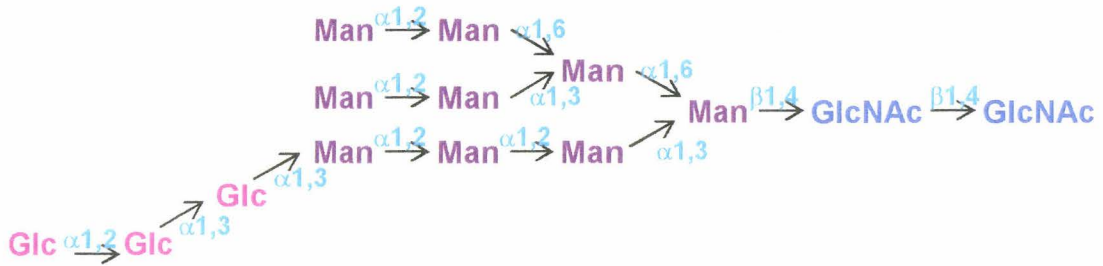


Figure 8 : Structure de l'oligosaccharide précurseur des *N*-glycannes

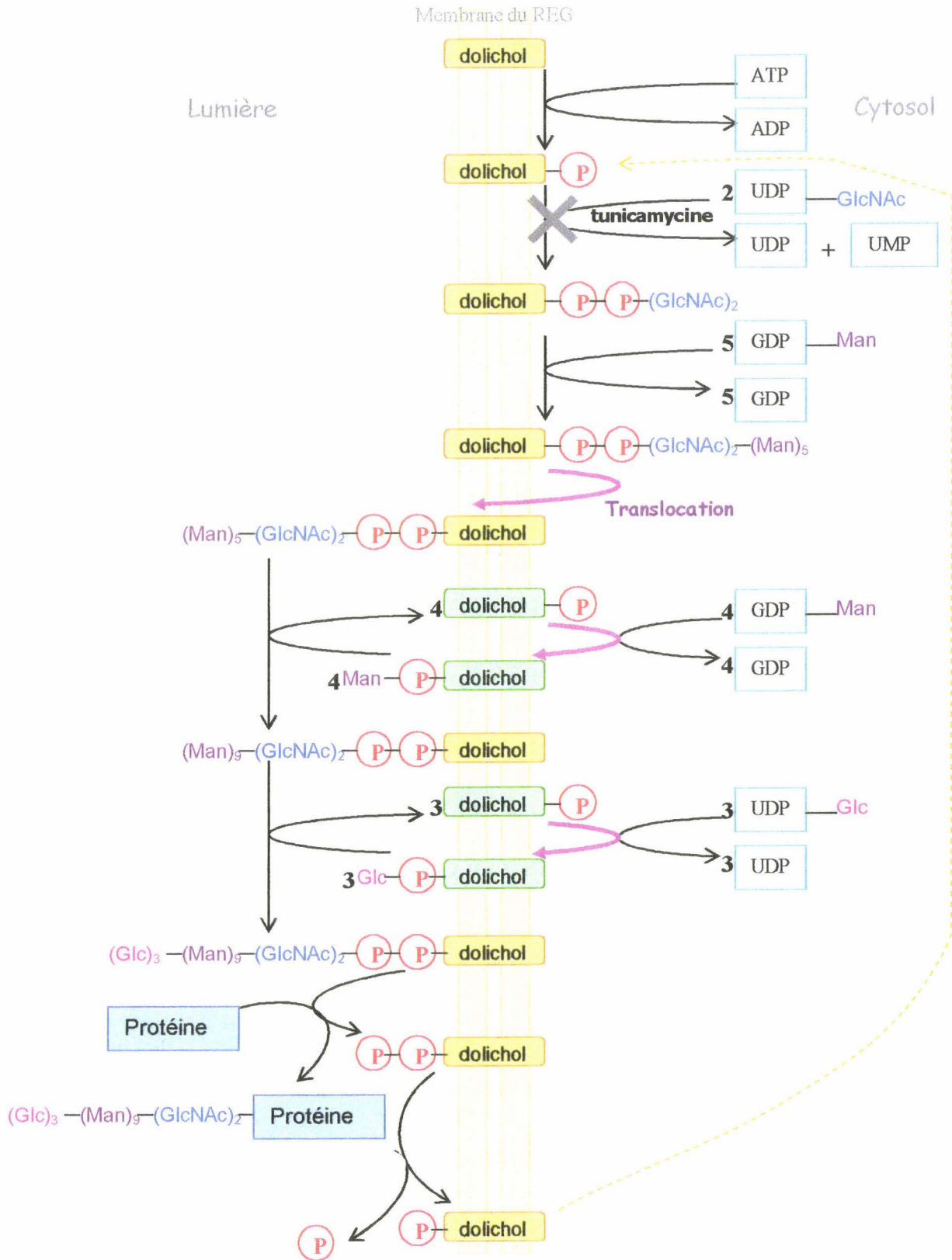


Figure 9 : Le cycle des dolichols

L'oligosaccharide transféré subit ensuite une première étape d'élagage (figure 10), assortie d'un contrôle de qualité de la mise en conformation de la protéine (Trombetta et Helenius, 1998). Les premiers résidus éliminés sont les résidus de glucose. Les glycoprotéines mal repliées subissent alors un cycle de déglucosylation-reglucosylation qui leur permet d'acquérir leur conformation. Les espèces monoglucosylées (de formule $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) sont en effet reconnues par des chaperons moléculaires tels que la calnexine ou la calréticuline. Cette interaction permet le recrutement d'enzymes intervenant dans la mise en conformation, comme la peptide disulfide isomérase (PDI), ou dans l'assemblage de sous-unités en complexes multimoléculaires. La glycoprotéine libérée est alors soumise à la glucosidase II qui clive le résidu de glucose. Si elle n'a pas encore acquis sa conformation finale, la glycoprotéine est substrat d'une glucosyltransférase qui transfère un nouveau résidu de glucose, permettant une nouvelle interaction avec la calnexine ou la calréticuline. Après un certain nombre de cycles, les glycoprotéines dont la mise en conformation a échoué sont éliminées : elles sont transportées par rétrotranslocation vers le cytosol où ont lieu la déglucosylation puis la dégradation par un complexe supramoléculaire spécialisé, le protéasome. Le glycanne permet de distinguer une glycoprotéine qui a échoué à se mettre en conformation d'une glycoprotéine nouvellement synthétisée qui n'a pas encore acquis sa conformation. Selon une hypothèse émergente, la glycoprotéine finit par être substrat de la mannosidase I réticulaire qui clive un résidu de mannose. Le glycanne $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ résultant est un mauvais substrat pour la glucosidase II et reste donc plus longtemps associé à la calnexine ou à la calréticuline (Helenius et Aebi, 2001 et Rudd *et al.*, 2001). Les glycoprotéines mal conformées sont ainsi retenues dans le reticulum puis envoyées vers la dégradation par une lectine spécialisée. Au contraire, les glycoprotéines mises en conformation portant du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, n'étant plus glucosylées, peuvent partir vers l'appareil de Golgi. Ce mécanisme de contrôle qualité, dont la compréhension est récente, assure que seules les glycoprotéines correctement mises en conformation donc biologiquement actives soient dirigées vers leur site d'action. On estime qu'un tiers environ des protéines nouvellement synthétisées subit la dégradation (Schubert *et al.*, 2000).

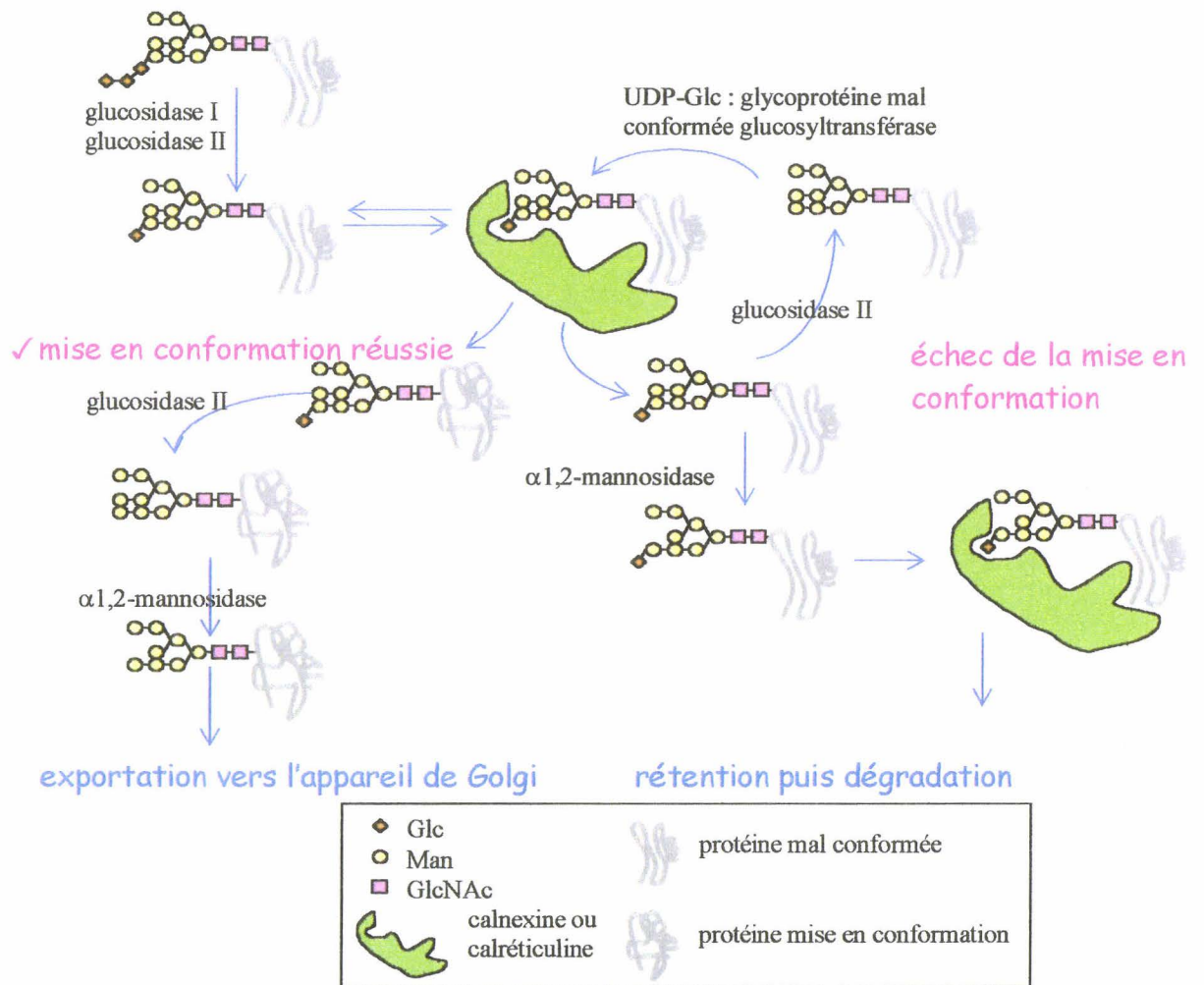


Figure 10 : Elagage et contrôle qualité des N-glycoprotéines dans le reticulum endoplasmique

3.2.2. Biosynthèse des ancras glycosyl phosphatidylinositol

Un précurseur est également formé dans la lumière du reticulum endoplasmique par l'addition séquentielle de monosaccharides sur une molécule de phosphatidylinositol, à partir d'UDP-GlcNAc et de trois molécules de Man-P-Dol. Le groupe éthanolamine-phosphate est fourni par une phosphatidyléthanolamine et transféré sur le mannose terminal. Il est intéressant de constater que la séquence des événements n'est pas la même chez l'homme et chez les trypanosomes (Ferguson, 1999).

L'ancrage GPI se fait par une réaction de transamidation qui élimine le peptide C-terminal. Le résidu du point d'attache varie selon les protéines, mais il est toujours caractérisé par une courte chaîne latérale non hydrophobe. Le signal d'ancrage GPI situé en aval de ce résidu est

clivé, il n'existe pas de séquence consensus mais on trouve en général un segment hydrophobe de 12 à 20 acides aminés. La nature des acides aminés adjacents au point d'attache ω est également importante : les résidus $\omega+2$ et, dans une moindre mesure, $\omega+1$, doivent être de petits acides aminés, tout comme le résidu ω (Kodukula *et al.*, 1993).

3.3. La glycosylation dans l'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi est divisé en saccules à l'équipement enzymatique distinct. Il est le siège de la maturation des *N*-glycannes formés dans le reticulum endoplasmique (figure 12), et de la biosynthèse, étape par étape, des *O*-glycannes. Les glycoprotéines traversent successivement les compartiments *cis*, *médian* et *trans* de l'appareil de Golgi avant d'être sécrétées. Les étapes tardives de glycosylation, c'est-à-dire l'addition des sucres périphériques, prennent place dans les saccules et dans le réseau *trans*-golgiens. Parmi les enzymes qui branchent ces résidus terminaux (fucosyl et sialyltransférases, mais aussi des sulfotransférases), certaines peuvent agir à la fois sur des *N*- et des *O*-glycannes, et des glycolipides (van den Eijnden, 2000).

3.3.1. Maturation des *N*-glycannes

Le cas des *N*-glycannes est le mieux documenté, car il existe une voie de biosynthèse très bien définie conduisant jusqu'aux *N*-glycannes de type complexe (Schachter, 1991). Le nombre d'antennes est déterminé par l'action de différentes *N*-acétylglucosaminyltransférases toutes capables de brancher une *N*-acétylglucosamine sur un mannose du noyau, mais par des liaisons différentes (figure 11) (Schachter, 2000).

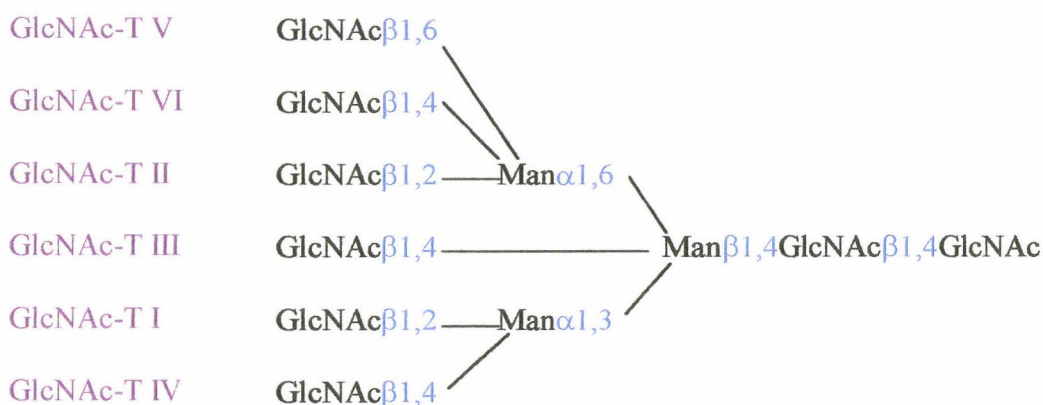


Figure 11 : Spécificité des différentes *N*-acétylglucosaminyltransférases impliquées dans la biosynthèse des *N*-glycannes

La GlcNAc-TI est une enzyme clé puisque son action est une condition *sine qua non* aux réactions catalysées par la mannosidase II et l' α 1,6-fucosyltransférase. C'est donc l'enzyme qui ouvre la voie vers le type complexe. Au contraire, la GlcNAc-TIII, qui n'agit qu'après la GlcNAc-TI, empêche l'action de la mannosidase II et bloque ainsi la maturation au type hybride.

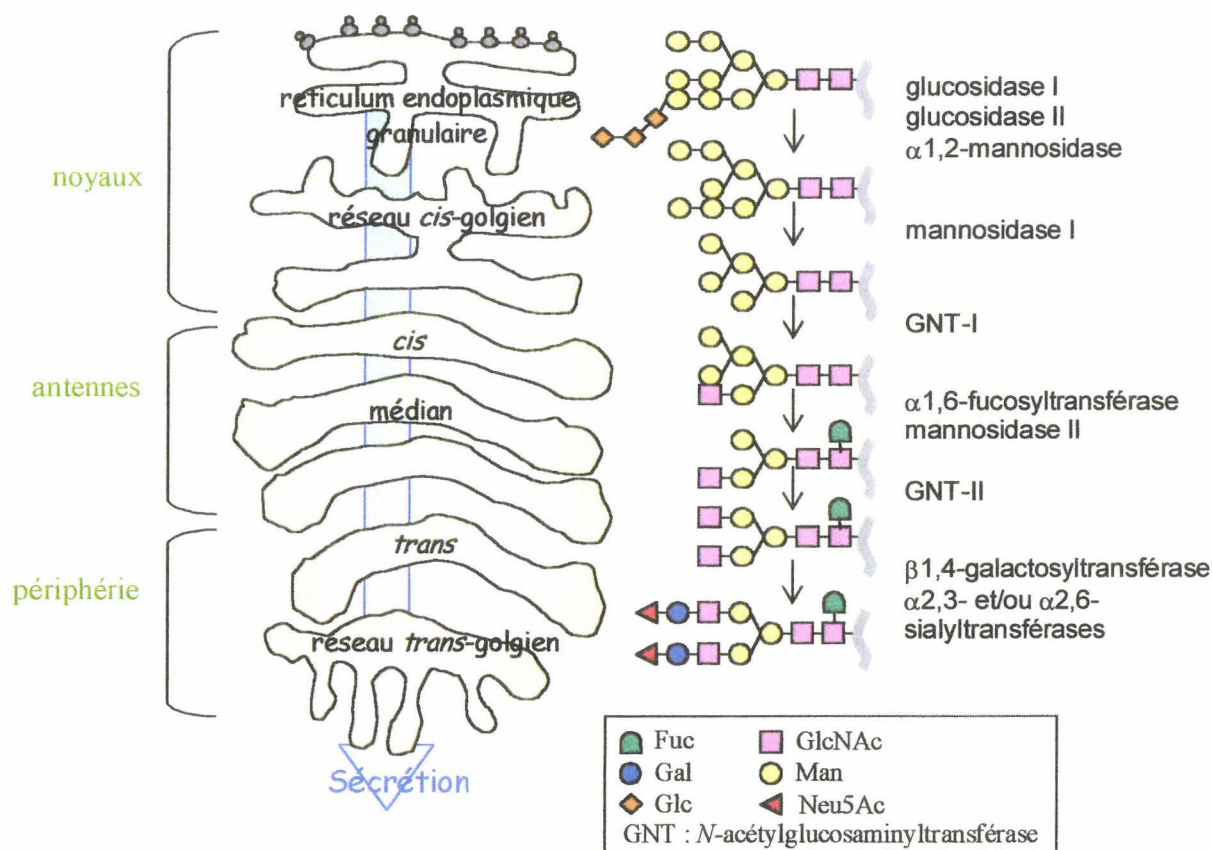


Figure 12 : Schéma de maturation des N-glycannes

3.3.2. Biosynthèse et maturation des O-glycannes

Moins bien connu, ce processus commence dans le *cis*-Golgi avec l'action d'une polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférase. Il n'existe pas de séquence consensus sur le polypeptide pour l'addition d'un O-glycane de type mucine, en revanche il existe plusieurs N-acétylgalactosaminyltransférases avec différentes spécificités d'accepteurs. Le noyau est complété par l'addition de Gal, de GlcNAc ou de GalNAc, probablement dans le Golgi médian. La voie biosynthétique qui est ensuite suivie, parmi l'énorme diversité de chemins possibles, dépend de nombreux facteurs : (i) la synthèse des précurseurs et leur transport vers l'appareil de

Golgi, (ii) la synthèse des enzymes et leur adressage vers le Golgi, (iii) la spécificité très fine des glycosyltransférases (ce que l'on peut résumer par la règle "3 avant 6" : la liaison en 3 doit être formée avant la liaison en 6), et la compétition entre des enzymes ayant les mêmes substrats, (iv) la présence de signaux de terminaison, par exemple un acide sialique ou un monosaccharide en anomérie α , (v) la présence de cofacteurs comme les cations divalents, (vi) le temps de résidence de la glycoprotéine dans l'appareil de Golgi. A ces facteurs il faut ajouter la structure tridimensionnelle locale des glycoprotéines, qui favorise ou non l'accès des glycosyltransférases. De plus, les glycosyltransférases du Golgi médian seraient organisées en complexe de haut poids moléculaire (Opat *et al.*, 2000) et il est probable que les glycoprotéines subissent l'action de plusieurs enzymes au sein d'un même complexe.

4. Rôles biologiques associés aux oligosaccharides

Dans une revue générale de 1993, A. Varki affirme que, s'agissant des rôles biologiques des oligosaccharides, "toutes les théories sont correctes". Il est extrêmement hasardeux de prédire la fonction d'un *O*- ou d'un *N*-glycane sur une protéine donnée, car aucune règle ne se dégage des très nombreux exemples examinés. Néanmoins, il est désormais clair que les défauts de la glycosylation, s'ils ont peu de conséquences sur les cellules en culture, sont *in vivo* la cause de désordres profonds. Chez l'homme, ces maladies regroupées sous le terme de CDG (congenital disorders of glycosylation) se manifestent par de multiples malformations et une mortalité précoce (pour revue, voir Marquardt et Freeze, 2001).

De façon générale, les glycannes constituent presque toujours une interface entre une protéine, un lipide ou une cellule et l'environnement. Ils ont par conséquent des effets variés allant de la structure à la communication intercellulaire :

- ☆ stabilisation de la conformation, solubilité, protection vis-à-vis de la température ou des protéases ;
- ☆ masquage d'épitopes ;
- ☆ signaux pour les trafics inter- et intracellulaire des protéines et leur destinée ;
- ☆ régulation ou modulation de l'activité des protéines ;
- ☆ interactions cellule-cellule, cellule-pathogène ou cellule-symbiote.

La variabilité inter- et intra-espèces des structures glycaniques, ainsi que la variabilité spatio-temporelle chez un même individu rend difficile l'association d'une structure glycanique donnée à une fonction particulière. Cependant, les structures inhabituelles sont plus susceptibles d'assurer une fonction spécifique : le cas des enzymes destinées au lysosome, triées au cours de leur passage dans l'appareil de Golgi grâce à un signal mannose-6-phosphate, est un exemple des plus convaincants (Fischer *et al.*, 1980). De même, ce sont des épitopes glucidiques particuliers qui déterminent l'appartenance à des groupes sanguins comme les systèmes A/B/O ou Lewis (Oriol, 1995) (voir figure 4).

5. Notion de glycosylation terminale

L'addition des sucres périphériques tels que le galactose, la *N*-acétylgalactosamine, le fucose ou les acides sialiques, ainsi que des modifications telles que la sulfatation, interviennent en fin de biosynthèse, sur des glycoprotéines comme sur des glycolipides. En outre, comme ces réactions se produisent dans les dernières vésicules de la voie de sécrétion, ces sucres terminaux se retrouvent majoritairement à la surface cellulaire ou dans les sécrétions. Etant exposés, ils sont les plus impliqués dans les fonctions biologiques. La glycosylation terminale est aussi la plus sujette aux variations, et supporte la spécificité d'espèce, de tissu, ou spatio-temporelle. Par opposition, le rôle des antennes ou des squelettes semble être essentiellement de porter ces motifs terminaux.

6. Les acides sialiques

6.1. Définition et structures

Les acides sialiques sont une large famille, dont une quarantaine de membres sont aujourd'hui connus (pour revue, voir Schauer, 2000 et Schauer et Kamerling, 1997). Ce sont des oses acides à 9 carbones formant un cycle pyranique qui dérivent tous de l'acide neuraminique (acide 5-amino-3,5-didéoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonique). Les dérivés les plus courants sont les formes *N*-acétylée ou *N*-glycolylée : l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) et l'acide *N*-glycolylneuraminique (Neu5Gc), respectivement. L'acide 2-céto-3-désoxynononique ou Kdn, forme désaminée de l'acide neuraminique, se rencontre également. La substitution des hydroxyles 4, 7, 8 et 9 par des groupements acétyles, méthyles, lactyles, sulfates ou phosphates, donne naissance aux nombreux dérivés répertoriés et dont la liste continue de s'allonger.

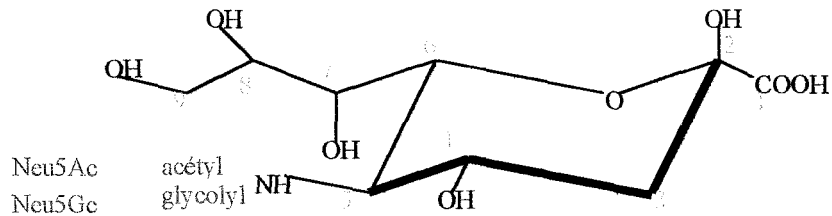


Figure 13 : Structure de base des acides sialiques

Le Neu5Ac est l'acide sialique le plus répandu, les autres dérivés sont souvent limités à des tissus ou des espèces particuliers. Le Neu5Gc est assez abondant dans le règne animal, mais il est absent des tissus humains adultes normaux. De plus, le Neu5Ac est considéré comme le précurseur de tous les autres acides sialiques, puisqu'ils sont formés à partir du Neu5Ac libre (qui peut être à l'origine de Neu5Gc), du CMP-Neu5Ac (dont l'hydroxylation fournit du CMP-Neu5Gc (Shaw et Schauer, 1988)) ou encore après le transfert sur un glycanne (c'est le cas des dérivés acétylés) (Klein et Roussel, 1998). La suite de l'exposé sera donc essentiellement limitée au Neu5Ac.

6.2. Impact des acides sialiques sur les glycoprotéines

Dans les glycoconjugués, les acides sialiques sont presque toujours en position terminale non réductrice. Ils sont liés en $\alpha 2,3$ ou en $\alpha 2,6$ sur des résidus de Gal, et en $\alpha 2,6$ sur des résidus de GalNAc ou de GlcNAc. Ils peuvent aussi former des chaînes d'acide polysialique où les résidus sont liés en $\alpha 2,8$. Ce type de structure existe notamment sur la molécule d'adhésion cellulaire neuronale (N-CAM) (Walsh et Doherty, 1996). Chez les bactéries, des chaînes d'acides sialiques liés en $\alpha 2,3$ constituent l'acide colominique.

6.2.1. Rôles structuraux liés aux acides sialiques

En conditions physiologiques, les acides sialiques sont toujours ionisés (Varki, 1997). Leur position terminale, leur grande taille, leur hydratation et leur caractère anionique influencent la conformation des glycoconjugués (Schauer et Kamerling, 1997) et font des acides sialiques, plus que le reste du glycanne, la véritable interface avec l'environnement. Ainsi, ils sont un composant essentiel du manteau cellulaire et des mucus, où ils exercent un effet protecteur vis-à-vis des attaques protéolytiques, des phagocytes et de certains agents pathogènes. La répulsion des charges peut empêcher l'agrégation cellulaire (Varki, 1992) ou favoriser la migration, notamment

des neurones embryonnaires ou des cellules tumorales. Inversement, l'interaction avec des cations divalents peut former des ponts intercellulaires qui contribuent à maintenir l'intégrité d'un tissu.

6.2.2. Implication des acides sialiques dans des phénomènes de reconnaissance

Un nombre croissant de lectines animales, végétales ou microbiennes spécifiques des acides sialiques est aujourd'hui connu (pour revue, voir Varki, 1997).

a. Interactions hôtes-pathogènes

L'exemple le plus connu est sans doute l'hémagglutinine du virus de l'Influenza qui reconnaît les acides sialiques de la cellule cible, permettant la pénétration dans la cellule. D'autres lectines spécifiques des acides sialiques ont depuis été identifiées chez de nombreux virus, citons par exemple l'hémagglutinine-neuraminidase du rubulavirus porcine (Reyes-Leyva, 1999), mais aussi chez des bactéries pathogènes comme *Helicobacter pylori* dont les adhésines reconnaissent les mucines gastriques ou chez des protozoaires parasites comme *Plasmodium falciparum* (Varki, 1997).

b. Processus d'adhésion et de migration cellulaires

Les lectines spécifiques des acides sialiques chez les mammifères ont été classées en deux familles : (i) les sélectines et (ii) les sialoadhésines encore appelées *siglecs*. Mais d'autres lectines comme le facteur H du complément n'appartiennent à aucun de ces groupes.

Les sélectines sont impliquées dans la communication entre les cellules endothéliales d'une part et les lymphocytes, les phagocytes ou les plaquettes d'autre part, cruciale dans la domiciliation des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques ou leur recrutement sur les lieux d'inflammation. Il existe trois types de sélectines : E (endothéliale), L (leucocytaire) et P (plaquettaire), ayant des spécificités différentes. Leurs ligands sont des motifs sialylés de type Lewis mais il semble qu'elles reconnaissent aussi l'axe protéique ou lipidique (Varki, 1992 et 1997).

Les sialoadhésines sont des membres de la superfamille des immunoglobulines apparentées à la sialoadhésine des macrophages et comprennent le CD22 (un marqueur des lymphocytes T et B), le CD33 (un marqueur des cellules myéloïdes et des macrophages), et la glycoprotéine associée à la myéline (MAG), qui, en reconnaissant des gangliosides à la surface

des neurones, participe au maintien de la myéline (Varki, 1997) et inhibe la croissance des neurites (Walsh et Doherty, 1996).

6.2.3. Implication de la désialylation dans la clairance des glycoprotéines circulantes

Outre un effet général de masquage d'antigènes portés par le reste de la glycoprotéine, les acides sialiques peuvent servir à protéger des épitopes spécifiques, en particulier le galactose. Ainsi, les glycoprotéines désialylées portant des résidus Gal exposés sont rapidement éliminées de la circulation grâce à un récepteur à Gal situé à la surface des hépatocytes (Ashwell et Harford, 1982 et Chitlaru *et al.*, 1998). Ce phénomène est aussi vrai pour des cellules : la désialylation des érythrocytes conditionne leur capture par les macrophages (Pfannschmidt et Schauer, 1980 et Bratosin *et al.*, 1995) et semble être un indicateur de leur sénescence *in vivo*.

7. La glycosylation des protéines recombinantes thérapeutiques

En résumé, les glycannes peuvent avoir des impacts variés et totalement imprédictibles sur les protéines recombinantes, allant du trivial au crucial. Si le génie génétique permet de contrôler parfaitement la séquence de l'axe peptidique, la structure des chaînes glycaniques dépend, comme discuté précédemment : (i) de l'équipement enzymatique de la cellule hôte, (ii) de la protéine elle-même, (iii) de son taux d'expression, qui joue sur la disponibilité des enzymes, mais aussi (iv) des conditions de culture (Goochee et Monica, 1990 et Jenkins, 1995). Une glycosylation incorrecte peut avoir des conséquences majeures sur l'antigénicité, la pharmacocinétique ou l'activité biologique (pour revue, voir Cumming, 1991, et Bhatia et Mukhopadhyay, 1999).

Par conséquent, la production d'une protéine recombinante naturellement glycosylée exige un contrôle minutieux à plusieurs niveaux (Jenkins *et al.*, 1996) qui explique le temps et les coûts de développement des glycoprotéines thérapeutiques. Les structures glycaniques associées à une protéine recombinante seront le reflet des capacités de glycosylation de la cellule hôte, dont le choix est alors crucial.

III. Produire des glycoprotéines recombinantes dans le système baculovirus-cellules d'insectes

1. Présentation du système

Bien que l'expression de protéines recombinantes ait été décrite dans d'autres types de cellules d'insectes, comme celles de drosophile (Benting *et al.*, 2000), le système baculovirus-cellules d'insectes utilise des lignées cellulaires de Lépidoptères (papillons) ou, éventuellement, des larves entières. Notons que les cellules d'insectes peuvent également être transfectées pour l'expression stable de gènes d'intérêt (Jarvis et Guarino, 1995).

1.1. Les cellules de Lépidoptères

Les lignées couramment utilisées sont issues de différentes espèces, de différents tissus, à différents stades de développement. La lignée Sf9, établie à partir de cellules ovariennes de pupes de *Spodoptera frugiperda*, est la mieux connue et la plus utilisée.

Les cellules de Lépidoptères se cultivent entre 25 et 30°C, en milieu tamponné (pH de 6,2 à 6,4) sans exigence particulière en CO₂ (Summers et Smith, 1987). Elles peuvent croître en suspension à haute densité comme en monocouches et être adaptées à la culture sans sérum.

1.2. Les baculovirus

1.2.1. Définition et classification

Pour revue : Blissard et Rohrmann, 1990 ; Devauchelle et Cerutti, 1993 et 1999.

Les Baculoviridae sont une large famille de virus qui infectent des Arthropodes. Ils ont été décrits chez plus de 600 espèces d'insectes dont une majorité de Lépidoptères et chez quelques crustacés. En revanche, ils ne sont pathogènes ni pour les Vertébrés, ni pour les végétaux. Leur génome, constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire circulaire et superenroulée, est contenu dans une capsidie ayant la forme d'un bâtonnet de 350nm de longueur et de 50nm de diamètre.

Les Baculoviridae se divisent en deux groupes : les Eubaculoviridae, qui forment des corps d'inclusion à l'intérieur des cellules infectées, et les Nudibaculoviridae, qui n'en forment pas. Parmi les Eubaculoviridae, on distingue, selon la forme des corps d'inclusion, le genre granuloze (GV, Granulosis Virus) et le genre polyédrie nucléaire (NPV, Nuclear Polyhedrosis

Virus). Ces derniers ont été les plus étudiés et sont utilisés pour la production de protéines recombinantes, et plus particulièrement le virus AcMNPV ou AcNPV (*A. californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus), isolé à l'origine de larves d'*Autographa californica*. Ce virus, auquel se limitera la suite de l'exposé, est capable de se multiplier dans le noyau de plus de 30 espèces.

1.2.2. Cycle naturel du baculovirus

Au cours de son cycle, le baculovirus prend deux formes fonctionnellement distinctes : les particules virales extracellulaires enveloppées et les particules virales incluses dans des polyèdres (figure 14). Ces dernières sont la forme de résistance responsable de la transmission horizontale du virus. Elles sont constituées de polyédrine, une protéine virale de 29kDa, qui forme une matrice de structure paracrystalline renfermant plusieurs nucléocapsides (Miller, 1988).

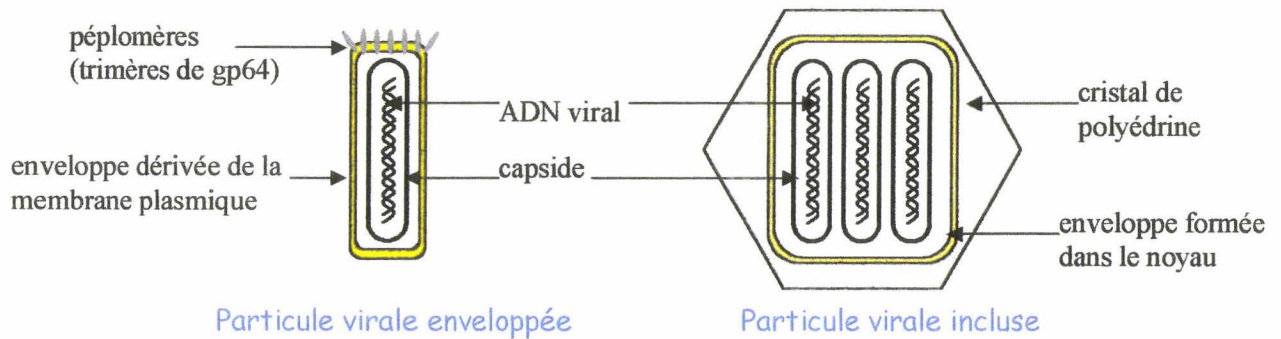


Figure 14 : Les deux formes du baculovirus

Lorsqu'une larve ingère des polyèdres, le pH alcalin (10,5) de l'intestin les dissout rapidement et libère les particules virales qui pénètrent dans les cellules de l'épithélium intestinal par fusion membranaire (figure 15). Les nucléocapsides sont transportées jusqu'au noyau où le virus commence à se répliquer. Dès 12h post-infection (p.i.), des nucléocapsides apparaissent par bourgeonnement à partir de l'enveloppe nucléaire, cette première enveloppe est perdue dans le cytoplasme, et les nucléocapsides acquièrent une nouvelle enveloppe en bourgeonnant à partir de la membrane plasmique (Blissard et Rohrmann, 1990). L'infection systémique, où le virus se propage dans tous les tissus, est due à ces particules enveloppées, qui sont couvertes de la glycoprotéine gp64 (ou gp67) (Volkman *et al.*, 1984 et Whitford *et al.*, 1989). Cette glycoprotéine, spécifique des particules enveloppées, est très conservée chez les baculovirus du genre NPV. Elle s'assemble en trimères qui forment des épines ou péplomères (Oomens *et al.*,

1995). Elle joue plusieurs rôles : (i) elle est indispensable au bourgeonnement des particules enveloppées à partir de la membrane plasmique (Oomens et Blissard, 1999) ; (ii) elle est impliquée dans la reconnaissance spécifique de la cellule hôte, permettant l'endocytose (Hefferon *et al.*, 1999), et (iii) elle est capable de médier la fusion de membranes à pH acide, comme dans l'endosome, ce qui permet la libération de la nucléocapside dans le cytosol (Kingsley *et al.*, 1999).

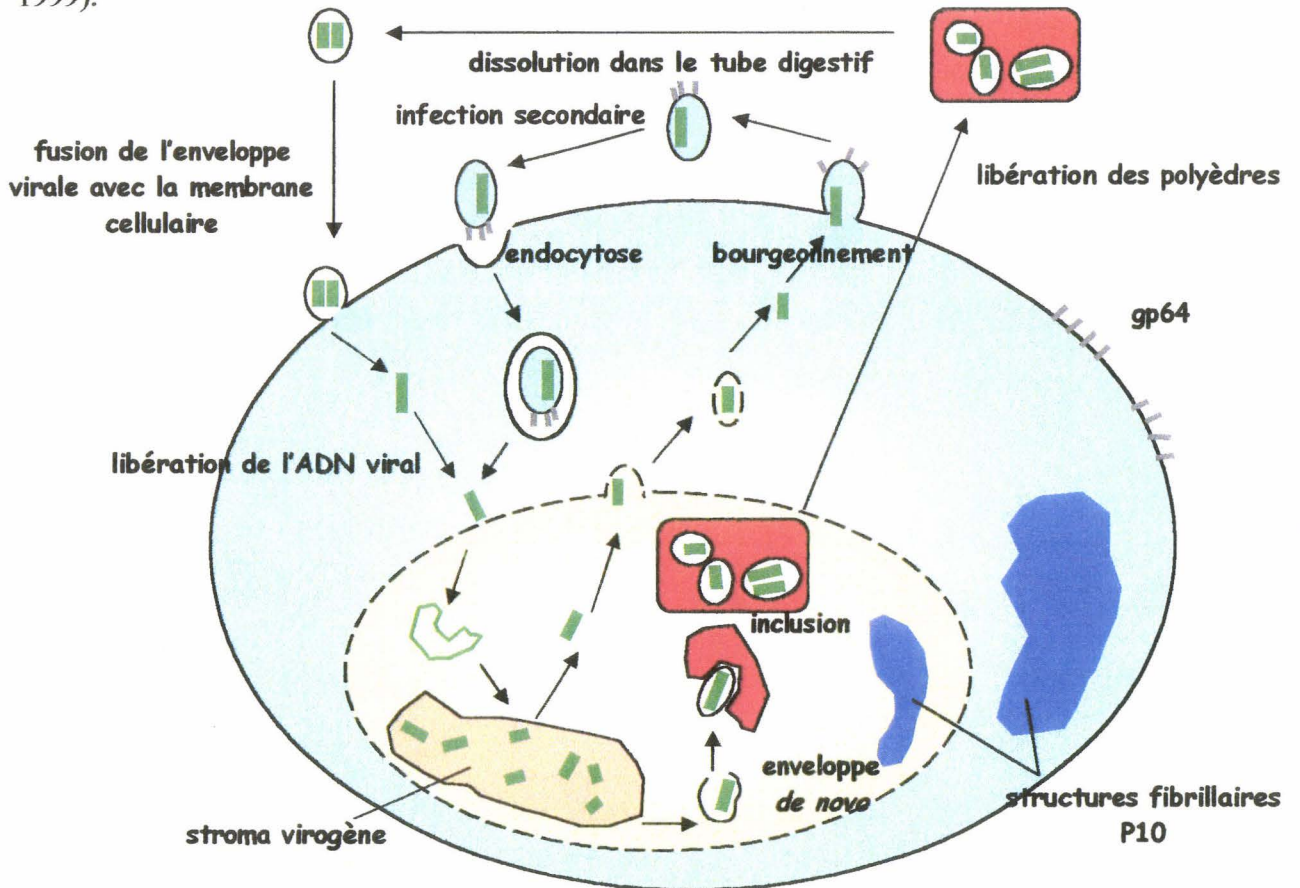


Figure 15 : Cycle infectieux du baculovirus

On distingue généralement quatre phases dans l'expression des gènes du baculovirus AcMNPV : Les gènes des phases très précoce (de 0 à 4h p.i.) et précoce (de 5 à 7h p.i.) s'expriment avant la répllication de l'ADN. Les gènes tardifs (de 8 à 18h p.i.) codent des protéines de structure, dont la protéine de capsid P39. En phase très tardive (après 18h p.i.), deux gènes au moins sont très fortement exprimés : le gène *p10* et celui de la polyédrine (Devauchelle et Cerutti, 1993). Toutefois, le gène de la gp64 est exprimé en phases précoce et tardive grâce à deux promoteurs distincts (Oomens *et al.*, 1995).

2. Application à l'expression de gènes étrangers

Historiquement, les baculovirus ont d'abord suscité l'intérêt pour leur potentielle application comme pesticides biologiques. Mais ils sont rapidement devenus un système très populaire d'expression de gènes eucaryotes, grâce aux propriétés de la polyédrine : ce gène possède un promoteur très fort, n'est pas essentiel *in vitro*, et fournit un marqueur de sélection très pratique. Ces observations ont conduit Smith *et al.* (1983) à utiliser pour la première fois AcMNPV comme vecteur pour produire l'interféron β . Depuis, 3000 à 4000 gènes ont été exprimés dans ce système, le plus souvent avec succès.

2.1. Insertion d'un gène étranger dans le baculovirus

(d'après Summers et Smith, 1987 ; Devauchelle et Cerutti, 1993 et Jarvis, 1997)

La grande taille du génome des baculovirus (130 kilobases dans le cas d'AcMNPV) interdit dans la plupart des cas les manipulations directes avec des enzymes de restriction. Il est donc nécessaire de passer par un vecteur plasmidique de transfert dans lequel est inséré le gène ou l'ADN complémentaire à exprimer. Un vecteur de transfert classique contient le promoteur de la polyédrine avec les séquences flanquantes amont et aval, mais le cadre de lecture du gène lui-même est éliminé ou interrompu, et comporte un ou des site(s) de clonage. Le vecteur de transfert chargé du gène d'intérêt est mélangé avec de l'ADN viral nu puis ce mélange est introduit dans les cellules d'insectes au cours d'une étape appelée cotransfection. Une recombinaison homologue peut se produire entre le vecteur de transfert et l'ADN viral. Cet événement est rare, mais les virions recombinants qui en résultent se multiplient aussi bien et se distinguent facilement des virions non recombinés grâce à l'absence de polyèdres. En pratique, le mélange de virus recombinants et non recombinants est mis en présence de cellules sur lesquelles est ensuite étalé un milieu semi-gélifié (de l'agarose) qui permet la croissance cellulaire mais empêche la dispersion des virions. En quelques jours, des plages de lyse sont visibles dans le tapis cellulaire. Sous microscope, les plages avec polyèdres se distinguent nettement des plages sans polyèdre, correspondant aux virus recombinants.

Ultérieurement, la même stratégie a été appliquée avec l'autre gène très tardif du baculovirus, *p10*. Ce gène exprimé légèrement plus tôt que celui de la polyédrine code une protéine qui forme des structures fibrillaires et dont le rôle probable dans la lyse cellulaire n'est pas encore très clair, mais qui n'est pas nécessaire *in vitro*. Dans ce cas, pour faciliter la sélection

des recombinants, les virus utilisés sont modifiés par délétion de toute la région polyédrique et par réinsertion du gène de la polyédrique sous le contrôle du promoteur de *p10* (thèse de H. Chaabihi, 1992).

2.2. Atouts et limites du système pour la production de glycoprotéines recombinantes

Le système baculovirus-cellules d'insectes offre l'avantage de pouvoir obtenir, dans des temps relativement courts, des vecteurs recombinants faciles à sélectionner et de très hauts niveaux d'expression, allant de quelques dizaines à quelques centaines de milligrammes par litre de culture (Fraser, 1992). A titre d'exemple, Shinkai *et al.* (1997) rapportent que la même quantité de fucosyltransférase recombinante peut être purifiée à partir d'une culture de cellules d'insectes que d'une culture 100 fois plus importante de cellules lymphoblastiques humaines. Exprimée sous le contrôle d'un promoteur tardif, une protéine recombinante peut représenter 50% des protéines totales. Certaines lignées, comme les Tn5 (appelées Hi-5 ou high-five) de *Trichoplusia ni*, donneraient de meilleurs rendements.

La simplicité avec laquelle se cultivent les cellules d'insectes (notamment l'indépendance vis-à-vis du CO₂) est une autre raison de leur succès. En outre, elles peuvent être cultivées sans sérum, donc à moindre coût.

Une autre considération importante est liée à la sécurité : aucun virus de vertébré ne peut se multiplier dans les cellules de Lépidoptères employées et aucun prion n'a à ce jour été identifié chez ces insectes. Quant au baculovirus, il ne peut pas accomplir son cycle lytique dans les cellules de Vertébrés.

Enfin, les cellules d'insectes réalisent la plupart des modifications post-traductionnelles courantes (pour revue, voir Klenk, 1996) : formation de ponts disulfures, oligomérisation, acylation, phosphorylation se font généralement conformément aux protéines natives. L'insertion membranaire est également efficace : des récepteurs (Cahoreau *et al.*, 1994 et Loisel *et al.*, 1997), des canaux ioniques (Julien *et al.*, 1999) et des protéines d'enveloppe virale (Thomsen *et al.*, 1993 ; Garnier *et al.*, 1995 et Munro *et al.*, 1999) ont ainsi été exprimées. Quant aux clivages protéolytiques intervenant dans la maturation de certaines protéines, ceux qui sont médiés par des enzymes comme la furine, ubiquiste chez les mammifères, sont correctement réalisés. Par contre,

des protéines clivées par des enzymes plus spécifiques peuvent ne pas être coupées dans les cellules d'insectes.

Cependant, le système est perfectible : le caractère lytique du système et les très hauts niveaux d'expression ont pour conséquence que les capacités de maturation et de sécrétion des cellules sont engorgées, ce qui explique en partie que les modifications post-traductionnelles se font de façon moins efficace (van Oers *et al.*, 2001). Diverses améliorations ont été apportées : pour les protéines et glycoprotéines sécrétées, le remplacement de la séquence signal et de la proséquence d'origine par des séquences d'insectes peut améliorer significativement la maturation et la sécrétion (Tessier *et al.*, 1991 et Jarvis *et al.*, 1993). L'utilisation de promoteurs moins forts que celui du gène de la polyédrine rend également la sécrétion et la maturation plus complètes (Sridhar et Hasnain, 1993). Une autre étude montre que la mise en conformation des protéines recombinantes est plus efficace dans une lignée transfectée exprimant une protéine chaperon (Lenhard et Reiländer, 1997). Néanmoins, la glycosylation, détaillée ci-après, reste l'une des limites majeures du système.

2.3. Exemples d'applications thérapeutiques

Des protéines exprimées dans le système baculovirus-cellules d'insectes sont employées en routine dans des tests diagnostics (Devauchelle et Cerutti, 1999). Mais un autre domaine très prometteur est la production de candidats vaccins qui se révèlent immunogènes chez l'animal. Des vaccins à usage vétérinaire sont déjà sur le marché, notamment le vaccin contre la fièvre aphteuse, développé par la société Intervet et commercialisé aux Etats-Unis, ou contre la grippe aviaire (Swayne *et al.*, 2000). Pour la thérapie humaine, des vaccins recombinants anti-cancer (Samanci *et al.*, 1998), contre le virus de l'immunodéficience humaine (Keefer *et al.*, 1994) ou contre l'agent du paludisme (Shi *et al.*, 2000) sont en cours d'évaluation clinique et pourraient prochainement arriver sur le marché. En 1998, l'épidémie de grippe de Hong-Kong, transmise de la poule à l'homme, a pu être contenue à l'aide du premier vaccin humain produit en cellules d'insectes, développé par la firme Protein Sciences Corporation.

3. **Potentiel de glycosylation des cellules d'insectes**

Pour revue, voir März *et al.*, 1995 et Altmann *et al.*, 1999.

Bien que les capacités de glycosylation des cellules d'insectes aient été nettement moins étudiées que celles des mammifères ou même des levures, les données concernant les structures portées par des glycoprotéines recombinantes produites en cellules de Lépidoptères commencent à s'accumuler. Malgré quelques discordances, un consensus s'établit : sur les glycoprotéines recombinantes, les sites de glycosylation sont généralement correctement occupés, mais les structures maturées sont plus courtes.

3.1. N-glycosylation

3.1.1. Biosynthèse

Les premières études ont concerné des Diptères et ont contribué à démontrer que le cycle des dolichols existait chez *Ceratitis capitata* (Quesada Allue et Belocopitow, 1978), chez les moustiques *Aedes aegypti* (Butters *et al.*, 1981) et *Aedes albopictus* (Hsieh et Robbins, 1984) ou chez la drosophile (Sagami et Lennarz, 1987 et Parker *et al.*, 1991). De plus ce cycle est, comme chez les mammifères, sensible à l'inhibition par la tunicamycine.

3.1.2. Structures glycaniques

a. Glycoprotéines endogènes

Les cellules d'insectes utilisent les mêmes sites de N-glycosylation que les cellules de mammifères, et les séquons qui sont les plus efficacement utilisés chez les mammifères le sont aussi dans les cellules d'insectes (Kawar et Jarvis, 2001). Néanmoins, les seuls N-glycannes ajoutés sont de structure oligomannosidique ($\text{Man}_{6-9}\text{GlcNAc}_2$), comme chez les mammifères, ou des glycannes tronqués, dits paucimannosidiques, de structure $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ou même, plus rarement, $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$. Ces dernières portent souvent sur le résidu GlcNAc d'attache du fucose en $\alpha 1,6$ et chez certaines espèces, en $\alpha 1,3$ (pour revue, voir Altmann *et al.*, 1999). Ces structures se retrouvent chez des lignées de Lépidoptères issues de *Mamestra brassicae* (IZD-Mb-0503), de *S. frugiperda* (Sf-21) et de *Bombyx mori* (Bm-N) (Kubelka *et al.*, 1994) et chez la drosophile (Seppo et Tiemeyer, 2000), ainsi que chez les Hyménoptères, notamment sur la phospholipase A₂ du venin d'abeille (Staudacher *et al.*, 1992a). Les résidus de fucose peuvent coexister sur le même glycanne mais il existe des structures monofucosylées sur l'une ou l'autre position. La fucosylation en $\alpha 1,3$ est plus rare, seules des traces sont détectables chez *S. frugiperda* et *B. mori*, et pas chez la drosophile (Staudacher *et al.*, 1992b).

b. Glycoprotéines recombinantes

La plupart des études structurales poussées révèlent que les structures sont essentiellement du type oligo- ou paucimannosidiques. Pour des glycoprotéines de mammifères produites dans le système baculovirus-cellules d'insectes, il est remarquable que les sites normalement occupés par des glycannes oligomannosidiques portent le même type de glycanne sur la glycoprotéine recombinante, alors que les glycannes de type complexe sont remplacés par des structures paucimannosidiques. Cette correspondance est nette pour la lactoferrine bovine exprimée dans des cellules de *M. brassicae* (Lopez *et al.*, 1997). D'autres analyses révèlent le même type de structure sur la gp120 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) exprimée dans des cellules Sf9 (Butters *et al.*, 1998), sur l'interféron $\omega 1$ (Voss *et al.*, 1993) ou encore sur le récepteur de l'interféron γ produits dans les mêmes cellules (Manneberg *et al.*, 1994). Certaines lignées semblent toutefois avoir un potentiel de maturation un peu plus poussé puisqu'on retrouve en position terminale des résidus de GlcNAc et même de Gal sur l'une ou l'autre branche des *N*-glycannes portés par divers glycoprotéines produites chez *T. ni* (Hsu *et al.*, 1997 ; Joshi *et al.*, 2000 et Rudd *et al.*, 2000) et *Estigmene acrea* (Ogonah *et al.*, 1996 et Hooker *et al.*, 1999). Néanmoins, l'existence de *N*-glycannes de type complexe sialylés a été rapportée sur une glycoprotéine, le plasminogène humain recombinant dans des cellules de *S. frugiperda* (Sf21) (Davidson *et al.*, 1990), de *M. brassicae* (IZD-Mb-0503) et de *Manduca sexta* (CM-1) (Davidson et Castellino, 1991b). Des structures tri- et tétraantennées apparaîtraient même en fin d'infection (Davidson et Castellino, 1991a). Ces travaux, où les structures des oligosaccharides ont été analysées par chromatographie d'échange d'anions à haute pression (HPAEC), associée à des digestions enzymatiques, restent le seul exemple de mise en évidence de *N*-glycannes de type complexe. Pour expliquer cette singularité, les auteurs font l'hypothèse que le plasminogène humain recombinant est un substrat exceptionnellement bon pour les glycosyltransférases qui synthétisent le type complexe et dont l'activité n'est qu'à l'état de traces. Néanmoins, le fait que l'infection modifie les structures glycaniques est réfuté par Kretzschmar *et al.* (1994).

3.1.3. Données enzymatiques

Pour comprendre l'origine des structures glycaniques originales synthétisées par les cellules d'insectes, les investigateurs se sont penchés sur les enzymes qui les produisent. Une $\alpha 1,2$ -mannosidase active sur le $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a été isolée et clonée à partir de cellules Sf9 par

Kawar *et al.* (1997), par homologie avec des séquences humaine, murine, de drosophile et de levure. Cette enzyme se distingue des α 1,2-mannosidases réticulaires IA et IB des mammifères par sa propriété de produire directement du $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (Kawar *et al.*, 2000). La mannosidase I golgienne (voir figure 12) a été mise en évidence puis purifiée dans des cellules Sf21 (Ren *et al.*, 1995 et 1997). Une mannosidase II sensible à la swainsonine a également été détectée dans plusieurs lignées (Altmann et März, 1995) puis clonée par Jarvis *et al.* (1997). Une étude d'Altmann *et al.* (1993) montre que des cultures de cellules de *S. frugiperda*, *B. mori* et *M. brassicae* contiennent des niveaux de *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GlcNAcT-I) comparables à ceux de cellules humaines, alors que l'activité *N*-acétylglucosaminyltransférase II détectée est beaucoup plus faible. De plus, les auteurs montrent que la fucosyltransférase dépend de l'action préalable de la GlcNAcT-I. Velardo *et al.* (1993) observent en outre que l'activité GlcNAcT-I augmente au cours de l'infection. Aucune activité β 1,4-galactosyltransférase n'est détectable (Jarvis et Finn, 1996), en revanche van Die *et al.* (1996) montrent l'existence d'une β 1,4-*N*-acétylgalactosaminyltransférase impliquée dans la synthèse de chaînons $\text{GalNAc}\beta$ 1,4 GlcNAc déjà identifiés chez diverses espèces non-mammifères. Cependant, ces structures ne sont jamais rencontrées chez les cellules d'insectes étudiées. Enfin, Staudacher *et al.* (1992b) étudient les activités fucosyltransférasiques de cellules de Lépidoptères d'une part et de cellules de la glande à venin de l'abeille *Apis mellifera* d'autre part. Alors que l'activité α 1,6-fucosyltransférase est présente dans toutes ces cellules, l'activité α 1,3-fucosyltransférase n'est détectée que chez l'abeille et les cellules de *M. brassicae*, pas chez celles de *B. mori* et *S. frugiperda*.

Une nouvelle piste pour expliquer les structures glycaniques courtes des cellules d'insectes est l'existence de glycosidases : dans ce sens, Licari *et al.* (1993) démontrent que des cellules de *S. frugiperda*, *T. ni*, *B. mori* et *Malacosoma distria* saines ou infectées par un baculovirus contiennent et sécrètent des activités β -*N*-acétylglucosaminidase, β -*N*-acétylgalactosaminidase, β -galactosidase et sialidase. En outre, Altmann *et al.* (1995) caractérisent une nouvelle β -*N*-acétylglucosaminidase membranaire, capable d'hydrolyser le GlcNAc terminal porté par la branche en α 1,3 d'un *N*-glycane biantenné mais inactive sur l'espèce $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$. Wagner *et al.* (1996a) montrent ensuite que cette enzyme est absente des cellules d'*E. acrea*, ce qui expliquerait les structures plus longues produites par ces cellules.

3.2. O-glycosylation

Les données sur la O-glycosylation sont beaucoup moins nombreuses mais plus homogènes, les structures retrouvées se limitant aux antigènes T (Gal β 1,3GalNAc-O-Ser/Thr) et Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) dans des proportions variées. L'antigène T a été caractérisé sur une mucine sécrétée de drosophile (Seppo et Tiemeyer, 2000). Lopez *et al.* (1999) ont également montré à l'aide de lectines que les cellules non infectées de *S. frugiperda* et *T. ni* présentaient un mélange de ces deux structures. Les auteurs caractérisent les activités enzymatiques correspondantes en analysant les produits par spectrométrie de masse en mode MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) et rapportent que les deux lignées présentent des niveaux de polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférase comparables à ceux des cellules de mammifères, par contre l'activité β 1,3-galactosyltransférase est plus faible, ce qui avait déjà été constaté par Thomsen *et al.* (1990) pour la lignée Sf9. Ces observations sont aussi vraies pour les cellules de *M. brassicae* qui présentent, en outre, une importante activité α 1,4-galactosyltransférase active sur l'antigène T (Lopez *et al.*, 1998) et absente des deux autres lignées.

Ces structures sont également décrites sur des glycoprotéines recombinantes dans des cellules Sf9 telles que la gp50 du virus de la pseudorange (Thomsen *et al.*, 1990), une protéine chimérique du virus syncytial respiratoire (Wathen *et al.*, 1991), sur la sous-unité β de la choriogonadotropine humaine (Chen *et al.*, 1991) et l'interféron α 2 humain (Sugiyama *et al.*, 1993), ainsi que sur l'interleukine 2 produite dans la lignée Sf21 (Grabenhorst *et al.*, 1993).

3.3. Autres types de glycosylation

3.3.1. Le signal mannose-6-phosphate

Une étude de Aeed et Elhammer (1994) montre que les cellules Sf9 n'expriment pas le signal de reconnaissance des enzymes lysosomales, le Man-6-P : la prorénine humaine exprimée à l'aide d'un vecteur baculovirus ne porte que des N-glycannes pauci- ou oligomannosidiques non phosphorylés, et aucune activité UDP-GlcNAc : enzyme lysosomale N-acétylglucosaminyl-phosphotransférase n'est détectable, même dans des cellules saines. En outre, le récepteur de Man-6-P reconnaît des protéines des fractions microsomales de cellules murines ou de CHO mais pas de Sf9.

3.3.2. La O-N-acétylglucosaminylation

La O-GlcNAc, glycosylation majeure des compartiments cytosolique et nucléaire, est observée pour le récepteur β des œstrogènes exprimé dans des cellules Sf9 (Cheng *et al.*, 2000). Ce résultat appuie le caractère ubiquiste de cette modification décrite par Wells *et al.* en 2001 (pour revue).

3.3.3. L'ancrage GPI

Il reste des contradictions quant à la capacité du système baculovirus-cellules d'insectes à réaliser cette modification. Quelques protéines à ancrage GPI ont été exprimées dans le système baculovirus, notamment le CD-80 dans des cellules Sf9 ou Hi-5 (Nagarajan et Selvaraj, 1999) pour lequel l'ancrage GPI est démontré par la sensibilité de la protéine à la phospholipase C (PIPLC), ou encore l'acétylcholine estérase de drosophile (Chaabihi *et al.*, 1994). L'aminopeptidase N, implantée dans la bordure en brosse intestinale, a été étudiée et clonée chez *M. sexta* (Luo *et al.*, 1999), et son ancrage GPI a été mis en évidence chez ce Lépidoptère. Exprimée grâce à un vecteur baculovirus dans des cellules Sf21, la protéine est correctement liée à un ancrage GPI, comme en témoigne sa sensibilité à la PIPLC. Par contre, les auteurs ne détectent dans ces cellules aucune protéine endogène qui porte un ancrage GPI.

Récemment, deux études du groupe de R. Schwarz suggèrent pourtant que la capacité des cellules Sf9 à réaliser l'ancrage GPI est limitée. Kedees *et al.* (2000) montrent que la protéine de surface de *Toxoplasma gondii*, SAG1, normalement ancrée par un GPI, ne l'est pas dans les cellules d'insectes infectées, bien que présente en surface. Les travaux d'Azzouz *et al.* (2000) montrent que des cellules Hi-5 non infectées sont capables de synthétiser des précurseurs d'ancres GPI et de les transférer sur des protéines naissantes, mais que l'infection abolit ce processus : l'étape qui est bloquée est la désacétylation de l'intermédiaire GlcNAc-PI en GlcNH₂-PI.

3.3.4. Glycannes à phosphono-éthanolamine

Une analyse structurale détaillée des N-glycannes liés à l'apolipoporphine III, une protéine de l'hémolymphe du criquet *Locusta migratoria* (Orthoptère), révèle de nouvelles structures de type complexe (c'est-à-dire portant un ou deux résidus de GlcNAc terminaux) contenant jusqu'à deux groupes 2-aminoéthylphosphonate (AEP), branchés en 6 sur le Man de la branche en α 1,6 ou sur le GlcNAc de l'autre branche (Hård *et al.*, 1993). Cette structure AEP se retrouve

également sur des glycosphingolipides équivalents des gangliosides de mammifères (Weske *et al.*, 1990).

3.4. Le problème de la sialylation

Le caractère controversé et essentiel d'un point de vue pharmacologique de cette question nous a conduits à lui consacrer une revue générale (Marchal, I., Jarvis, D.L., Cacan, R. et Verbert, A., 2001) (en annexe). Nous ne citerons ici que quelques exemples sélectionnés. En confrontant toutes les études sur des glycoprotéines endogènes ou recombinantes, particulières ou totales, obtenues à partir d'insectes variés, à divers stades de développement, ou de cultures cellulaires, il apparaît que s'il n'est plus contestable que la sialylation existe dans certains cas particuliers, c'est un processus absent ou très mineur dans les cellules d'insectes en culture, si l'on s'en tient aux études structurales les plus poussées.

La sialylation peut être étudiée de plusieurs façons : (i) par détection des activités enzymatiques ou (ii) par détection des structures formées. Quelques problèmes méritent l'attention : la présence de sialidase(s) mise en évidence par Licari *et al.* (1993) risque de fausser l'interprétation de l'absence d'acides sialiques et, inversement, la contamination par des sialoglycoprotéines contenues dans le sérum peut être source de faux-positifs. Les lectines peuvent être un outil facile et puissant à condition de disposer des contrôles adéquats. Les analyses structurales directes restent le moyen le plus sûr d'identification.

3.4.1. Sialylation de glycoprotéines endogènes

Dès 1963, Warren, dans un examen systématique des acides sialiques dans le règne animal, affirme que les insectes en sont dépourvus. Pourtant, quelques résultats récents le contredisent. A l'aide de la lectine de *Limax flavus*, Roth *et al.* (1992) détectent de façon très localisée de l'acide sialique dans des embryons de drosophile et confirment ce résultat par une analyse structurale en spectrométrie de masse. De plus, de l'acide polysialique est détecté grâce à un anticorps spécifique mais uniquement dans des embryons de 14h à 18h. Un autre groupe rapporte la présence d'acides sialiques dans les glandes prothoraciques larvaires et dans les testicules de pupes du Lépidoptère *Galleria melonella* (Karaçali *et al.*, 1997 et 1999). Ces études, qui combinent des méthodes histochimiques et la détermination structurale par spectrométrie de masse en mode impact électronique, montrent en outre que le contenu en acides sialiques décroît au cours du développement et suggèrent l'implication de la désialylation dans le vieillissement

(Karaçali *et al.*, 2000). L'existence d'acides sialiques dans les larves d'insectes semble se généraliser puisque Malykh *et al.* (1999) en caractérisent chez la cigale *Philaenus spumarius* (ordre des Homoptères), à l'aide du même panel de techniques. Les auteurs précisent que chez cet insecte, qui se nourrit exclusivement de végétaux, la contamination alimentaire est exclue.

Pourtant, la composition en monosaccharides des glycoprotéines des ovules de deux Lépidoptères, *T. ni* et *Danaus plexippus*, déterminée par HPAEC, ne révèle que des traces de Neu5Ac (Park *et al.*, 1999). Enfin, l'analyse à l'aide de lectines des glycoprotéines de lignées cellulaires de *S. frugiperda*, *T. ni* et *M. brassicae*, cultivées avec et sans sérum, montre l'absence d'acides sialiques (Lopez *et al.*, 1999).

3.4.2. Sialylation de glycoprotéines recombinantes

L'utilisation de lectines a indiqué la présence d'acides sialiques pour quelques glycoprotéines recombinantes dans le système baculovirus-cellules d'insectes (Vandenbroeck *et al.*, 1994 ; Davis et Wood, 1995 ; Russo *et al.*, 1998 et Pajot-Augy *et al.*, 1999). Toutefois, d'autres études donnent des résultats inverses (Lehman *et al.*, 1993 ; Voss *et al.*, 1993 ; Sugiyama *et al.*, 1993 ; Grossmann *et al.*, 1997 et van de Wiel *et al.*, 1998). Certains auteurs montrent l'absence d'acides sialiques par l'insensibilité à la neuraminidase (Luo *et al.*, 1992 et Wester *et al.*, 1997). Plus démonstratives, des méthodes de séparation des glycannes par chromatographie (Thomsen *et al.*, 1990 ; Hsu *et al.*, 1997 et Butters *et al.*, 1998) ou par électrophorèse (Kulakosky *et al.*, 1998 et Donaldson *et al.*, 1999) indiquent également l'absence d'acides sialiques sur diverses glycoprotéines recombinantes, le plasminogène humain recombinant (Davidson *et al.*, 1990 et Davidson et Castellino, 1991a et b) faisant donc figure d'exception. Enfin, les études ayant impliqué des analyses structurales par spectrométrie de masse montrent sans équivoque l'absence d'acides sialiques (Sugiyama *et al.*, 1993 ; Grabenhorst *et al.*, 1993 ; Ogonah *et al.*, 1996 ; Salmon *et al.*, 1997 ; Lopez *et al.*, 1997 ; Hooker *et al.*, 1999 et Rudd *et al.*, 2000).

3.4.3. Activités sialyltransférasiques et donneur d'acides sialiques

Quelques auteurs ont recherché dans des lysats ou des fractions de cellules d'insectes en culture des activités sialyltransférasiques, mais celles-ci restent indétectables (Butters *et al.*, 1981 ; Hooker *et al.*, 1999 et Lopez *et al.*, 1999). De plus, Hooker *et al.* (1999) signalent l'absence de CMP-Neu5Ac parmi les nucléotides solubles de cellules Sf9, Sf21 ou Ea4 non infectées ou de cellules Sf9 infectées. La même observation est faite pour des cellules Hi-5

(Tomiya *et al.*, 2001). Ces cellules ne contiennent pas non plus d'acides sialiques libres (Lawrence *et al.*, 2000).

Néanmoins, une séquence codante putative de β -lactosamide α 2,6-sialyltransférase (encore appelée ST6Gall) a été identifiée chez la drosophile (Farkas *et al.*, 2000, non publié, numéro d'accès à GenBank : AF218237), mais sa fonction n'a pas encore été vérifiée.

L'ensemble de ces résultats laisse prévoir que les glycoprotéines recombinantes dans le système baculovirus cellules d'insectes ne peuvent pas être sialylées. La modification du potentiel de glycosylation du système baculovirus-cellules d'insectes, en particulier pour la sialylation, reste donc un champ prometteur.

4. Ingénierie de la glycosylation dans le système baculovirus-cellules d'insectes

Pour revue, voir Jarvis *et al.* (1998).

4.1. Différentes stratégies

Une approche logique pour étendre les capacités de *N*-glycosylation des cellules d'insectes serait d'inactiver le gène de l'hexosaminidase golgienne, mais il n'a à ce jour pas été isolé. L'autre possibilité consiste donc à ajouter au système de nouvelles glycosyltransférases, en s'assurant que les cellules contiennent les donneurs monosaccharidiques nécessaires. Les gènes ou ADNc de ces enzymes peuvent être introduits dans le large génome du baculovirus ou insérés de façon stable dans les cellules.

Une autre voie, pour l'instant inexplorée, serait de réactiver les gènes des enzymes éventuellement responsables de la synthèse de glycannes de type complexe au cours du développement.

Enfin, on peut essayer de sélectionner un clone ou une sous-population de cellules ayant les capacités de glycosylation désirées : c'est la stratégie de Donaldson et Shuler (1999) qui ont sélectionné à l'aide d'une lectine spécifique des chaînons *N*-acétyllactosaminiques une sous-population de cellules d'*E. acraea*, mais dans ce cas les différences de glycosylation entre les cellules sélectionnées et les cellules parentales sont très ténues.

4.2. Etat de l'art

La coexpression dans des cellules Sf9 d'une hémagglutinine virale et de la GlcNAcT-I, à l'aide de deux vecteurs baculovirus différents, multiplie par 4 la quantité de résidus GlcNAc terminaux (Wagner *et al.*, 1996b). La β 1,4-galactosyltransférase exprimée grâce à un baculovirus sous le contrôle du promoteur précoce *ie1* permet à la gp64 d'acquérir des résidus de Gal reconnus par la lectine RCA (*Ricinus communis* agglutinin) (Jarvis et Finn, 1996). L'analyse structurale des *N*-glycannes produits par les cellules infectées par ce virus révèle des structures monogalactosylées sur la branche en α 1,3 (Wolff *et al.*, 1999 et Ailor *et al.*, 2000). Hollister *et al.* (1998) ont ensuite transfecté des cellules Sf9 avec l'ADNc de la β 1,4-galactosyltransférase sous le contrôle du même promoteur, et ont obtenu une lignée stable, Sf β 4GalT. Quand ces cellules sont infectées avec un virus sauvage ou recombinant, la gp64 est également galactosylée. Enfin, la même stratégie a été appliquée pour ajouter à ces cellules l'ADNc d'une α 2,6-sialyltransférase (Hollister et Jarvis, 2001). Les auteurs observent alors que la gp64 est réactive à la lectine SNA (*Sambucus nigra* agglutinin), spécifique de l'acide sialique lié en α 2,6, et ce uniquement quand les cellules sont cultivées en présence de sérum (dialysé ou non) ou d'une sialoglycoprotéine comme la fêtuine. Des observations similaires sont faites avec des cellules Hi-5 transfectées (Breitbach et Jarvis, 2001) ou pour des cellules Sf9 infectées avec un baculovirus recombinant exprimant les deux enzymes (Jarvis *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent une possible réutilisation, par les cellules transformées, des acides sialiques portés par des glycoprotéines du milieu.

Les mécanismes généraux de glycosylation discutés précédemment impliquent des enzymes, les glycosyltransférases, qui utilisent des donneurs spécifiques, sous forme de nucléotides-sucres. Ces molécules sont synthétisées aux dépens de nucléotides triphosphates dont le taux est étroitement corrélé à celui de l'ATP, et leur transfert est une réaction thermodynamiquement irréversible. Cependant, d'autres enzymes mettent en jeu un mécanisme tout à fait différent : la *trans*-glycosylation, qui permet le transfert direct d'un sucre d'un oligo- ou polysaccharide à un autre. Ce type de réaction est réversible et ne consomme pas de liaisons riches en énergie.

IV. La *trans*-sialidase : une alternative aux sialyltransférases chez certains trypanosomes

Certains parasites du genre *Trypanosoma*, incapables de synthétiser les acides sialiques pourtant indispensables à l'invasion des cellules hôtes, utilisent une réaction de *trans*-glycosylation grâce à une enzyme originale, la *trans*-sialidase. Cette enzyme, particulièrement bien étudiée chez *Trypanosoma cruzi*, catalyse le transfert de résidus sialyl des glycoconjugués de l'hôte vers ceux du parasite. L'intérêt qui lui est porté par plusieurs équipes de chercheurs en particulier latino-américains depuis une dizaine d'années repose à la fois sur son implication dans la biologie du parasite (ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle) et sur les multiples applications rendues possibles par son activité enzymatique inédite.

1. *Trypanosoma cruzi* et la maladie de Chagas

Trypanosoma cruzi est le parasite responsable de la trypanosomiase américaine découverte par Chagas en 1909, une affection endémique en Amérique latine, où elle cause la mort de plusieurs millions d'individus. Son cycle de vie complexe se déroule en plusieurs stades bien distincts, chez deux hôtes successifs, l'homme et un insecte hématophage. Le trypomastigote représente le stade infectieux pour les mammifères (figure 16), transmis lors de la piqûre d'un insecte contaminé du genre *Rhodnius* ou *Triatoma*.

Les premiers mois de l'infection sont caractérisés par une prolifération active du parasite dans divers tissus, en particulier le muscle cardiaque, l'appareil digestif et les cellules gliales du système nerveux central. De sévères encéphalites sont fréquentes au cours de cette phase aiguë. Une période asymptomatique lui succède, pouvant durer plusieurs années voire plusieurs décennies, avant l'installation de la maladie chronique caractérisée par de multiples neuropathies (Chuenkova et Pereira, 2000).

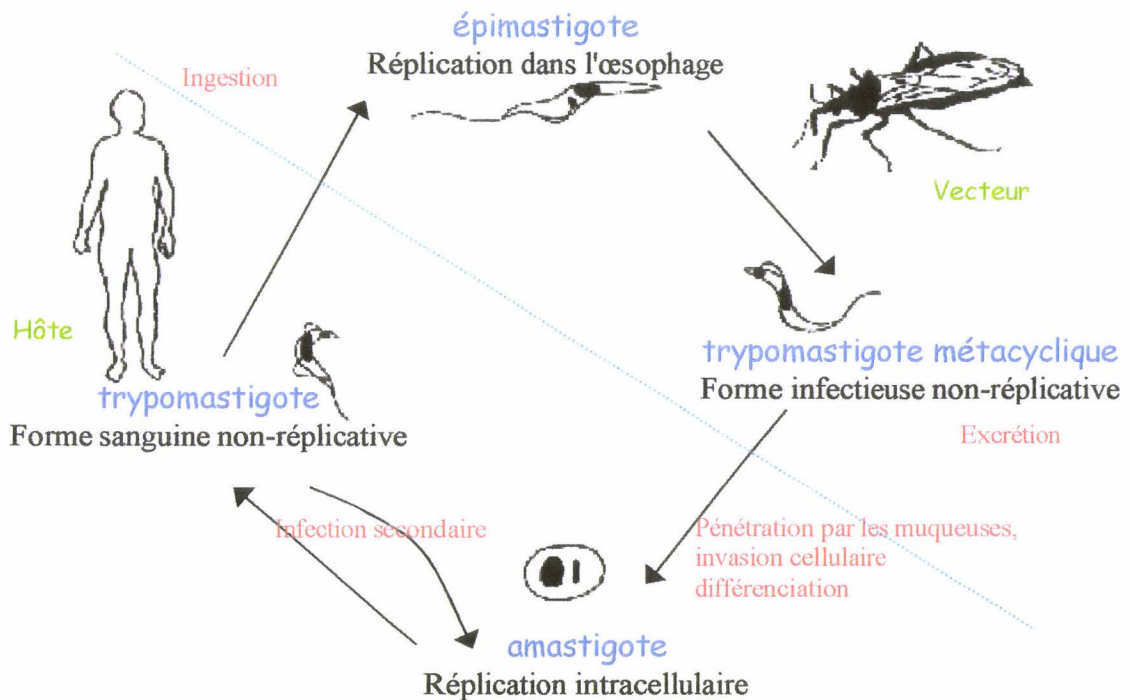


Figure 16 : Schéma du cycle de vie de *Trypanosoma cruzi* (d'après Cross et Takle, 1993).

2. La trans-sialidase

2.1. Découverte de la trans-sialidase

En 1983, Schauer *et al.* rapportent la caractérisation de résidus d'acides *N*-acétyl- et *N*-glycolylneuraminique à la surface d'épimastigotes et de trypomastigotes de *T. cruzi*, mais échouent dans les tentatives d'incorporation des précurseurs d'acides sialiques tels que l'acétate tritié ou la *N*-acétylmannosamine tritiée. Previato *et al.* (1985) proposent que l'acquisition d'acides sialiques par le parasite implique une *trans*-glycosylation. L'acide sialique libre n'est pas transféré (Zingales *et al.*, 1987), mais la fétuine est un excellent donneur. La sialylation des trypomastigotes en présence de fétuine stimule l'infection de cellules fibroblastiques (Piras *et al.*, 1987). L'enzyme est localisée à la surface du parasite et intervient dans la synthèse d'antigènes spécifiques du stade trypomastigote (Schenkman *et al.*, 1991). Une sialidase avait déjà été décrite chez *T. cruzi* (Pereira, 1983 ; Pereira *et al.*, 1991), mais Schenkman *et al.* (1992) démontrent que les activités sialidase et *trans*-sialidase sont portées par les mêmes enzymes.

L'activité *trans*-sialidase a également été détectée chez deux trypanosomes africains, *Trypanosoma brucei* et *T. congolense*, mais pas chez les autres Kinétoplastidés examinés (Engstler *et al.*, 1995).

2.2. Structure de la *trans*-sialidase

(Pour revue, voir Cross et Takle, 1993 et Schenkman *et al.*, 1994b).

Le génome de *Trypanosoma cruzi* contient au moins une centaine de gènes codant la *trans*-sialidase ou des protéines apparentées (Egima *et al.*, 1996), définissant une superfamille de gènes (Frasch, 2000). La *trans*-sialidase du stade trypomastigote est multimérique et constituée d'un mélange de polypeptides de tailles diverses (entre 100 et 220kDa), liés à la membrane par un ancrage GPI et pouvant être relargués dans le milieu (Frevet *et al.*, 1992). Seule la partie N-terminale est catalytique, la digestion par la papaïne produit un fragment de 70kDa actif (Schenkman *et al.*, 1994a et Campetella *et al.*, 1994). L'analyse des gènes de *trans*-sialidase montre que ce domaine est très conservé au sein d'une même souche et présente des éléments structuraux communs aux neuraminidases bactériennes et virales (Parodi *et al.*, 1992, et Pereira *et al.*, 1991), les motifs à aspartate, ou "Asp boxes" de séquence consensus SxDxGxTW. Ce domaine est suivi d'un second comportant des séquences de module de type III de fibronectine, appelé Fn3. Enfin, le domaine C-terminal est constitué de répétitions en tandem (Long Tandem Repeat, LTR) d'une séquence de 12 acides aminés (DSSAHSTPSTPA). Ce domaine de longueur variable s'achève par une séquence hydrophobe typique des protéines à ancrage GPI.

Les épimastigotes expriment, en phase stationnaire de prolifération uniquement, une *trans*-sialidase distincte de l'enzyme de trypomastigote : monomérique, elle ne possède pas de domaine LTR ni d'ancrage GPI mais est liée à la membrane *via* un segment protéique hydrophobe (Chaves *et al.*, 1993).

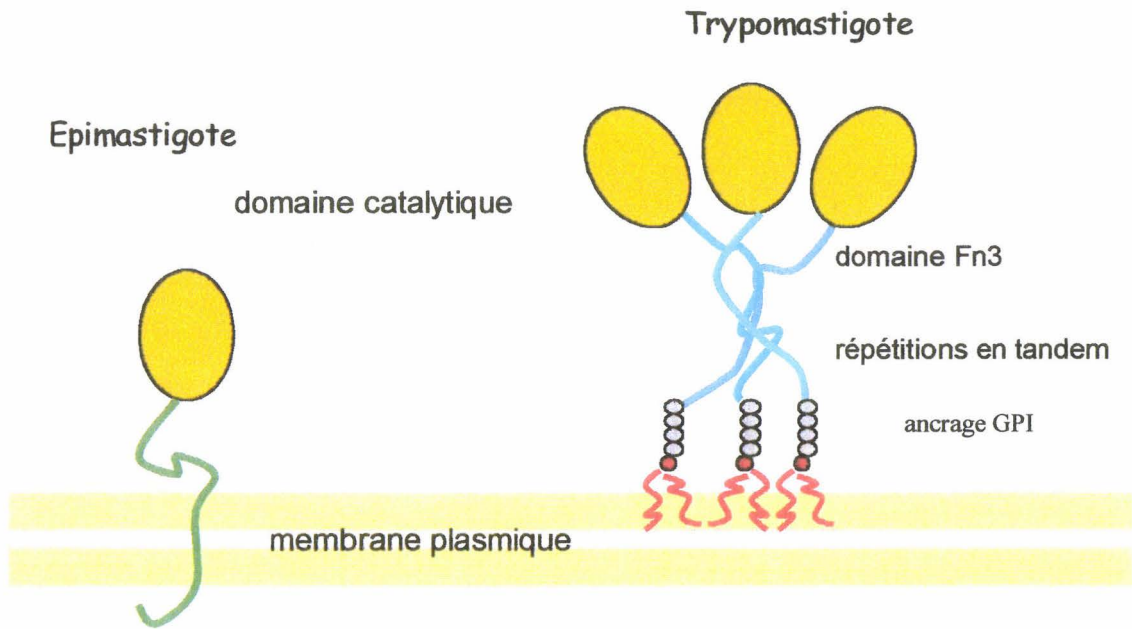


Figure 17 : Structure schématique des formes de *trans-sialidase* exprimées aux stades épimastigote et trypomastigote (d'après une revue de Schenkman *et al.*, 1994b).

2.3. Activité catalytique de la *trans-sialidase*

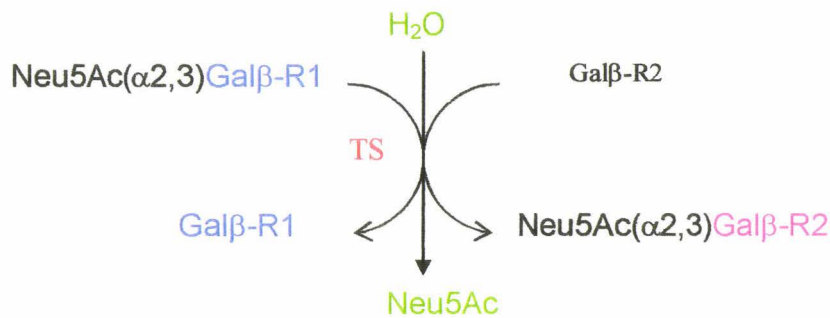


Figure 18 : Schéma général des réactions catalysées par la *trans-sialidase* de *Trypanosoma cruzi*

2.3.1. Spécificité de substrats

La spécificité a été étudiée en détails (Vandekerckhove *et al.*, 1992, Ferrero-Garcia *et al.*, 1993 et Scudder *et al.*, 1993). Seuls les résidus sialyl liés en $\alpha 2,3$ sur des résidus β -galactosyl d'oligosaccharides, de glycoprotéines ou de glycolipides sont transférés, les acides sialiques liés en $\alpha 2,6$, $\alpha 2,8$ ou $\alpha 2,9$ n'étant pas donneurs. L'acide *N*-glycolylneuraminique semble être aussi

bien transféré que l'acide *N*-acétylneuraminique, ainsi qu'un certain nombre d'autres dérivés. L'acide sialique libre n'est pas transféré, en revanche des hétérosides comme l'acide 4'-méthylumbelliféryl *N*-acétylneuraminique (4MU-NANA) ou l'acide 2-*O*-(*p*-nitrophenyl)-*N*-acétyl- α -neuraminique sont de bons donneurs.

Divers glycoconjugués (glycolipides et glycoprotéines) ou oligosaccharides peuvent servir d'accepteurs, à condition de présenter des résidus de β -galactose en position terminale non réductrice. L'un des meilleurs accepteurs est le lactose, mais la *trans*-sialidase est active sur une grande variété d'autres motifs. *In vivo*, les accepteurs à la surface du parasite sont surtout des *O*-glycoprotéines de type mucine (Schenkman *et al.*, 1993) et liées à la membrane par un ancrage GPI.

2.3.2. Activités sialidase et *trans*-sialidase

Si la plupart des glycosidases sont théoriquement capables de catalyser des réactions de transfert en présence d'excès de substrats, elles sont généralement plus efficaces comme hydrolases. A l'inverse, la *trans*-sialidase de *T. cruzi* semble avoir évolué vers l'acquisition d'une activité transférase beaucoup plus efficace en conditions physiologiques que son activité d'hydrolase (Scudder *et al.*, 1993). Cette dernière augmente en l'absence d'accepteur et avec la température (Ribeirao *et al.*, 1997), ce que les auteurs expliquent par une affinité diminuée de l'enzyme pour l'accepteur : la température optimale pour la *trans*-sialylation est de 13°C alors qu'elle est de 35°C pour l'hydrolyse. En construisant des hybrides entre la *trans*-sialidase de *T. cruzi* et la sialidase de *T. rangeli*, Smith et Eichinger (1997) montrent que le domaine Fn3 joue un rôle dans l'activité de transfert. Mais l'élément essentiel est la présence d'un site accepteur de galactose, que Chuenkova *et al.* (1999) identifient par des expériences de délétion dans le domaine N-terminal. La comparaison des structures tridimensionnelles de la sialidase de *T. rangeli* cristallisée et de la *trans*-sialidase de *T. cruzi* modélisée semble confirmer l'existence de ce site de fixation du galactose (Buschiazzo *et al.*, 2000).

2.4. Fonctions biologiques de la *trans*-sialidase

In vivo, la *trans*-sialidase utilise des sialoglycoconjugués (glycoprotéines circulantes ou glycoconjugués membranaires des cellules endothéliales) de l'hôte pour sialyler des glycoprotéines à ancrage GPI et riches en *O*-glycannes de la surface des trypomastigotes. Pour

l'hôte, l'incidence de cette désialylation n'est pas encore comprise. Il est en revanche clair que la sialylation des parasites augmente leur infectivité envers différents types cellulaires (Piras *et al.*, 1987) en générant des épitopes particuliers impliqués dans l'invasion (Schenkman *et al.*, 1991), elle masque certains antigènes, notamment des résidus α -galactosyl (Pereira-Chioccola et Schenkman, 1999) et augmente vraisemblablement leur résistance au complément. Au contraire, la désialylation des trypomastigotes augmente leur infectivité vis-à-vis des phagocytes, probablement *via* les récepteurs à galactose des macrophages. La sialylation des cellules cibles influence également l'infectivité, ce qui suggère un rôle de lectine à acides sialiques pour la *trans*-sialidase. Mais des versions inactives de *trans*-sialidase pourraient aussi se comporter comme des lectines à β -galactose (Frasch, 2000). Après l'invasion cellulaire, les trypomastigotes doivent sortir de la vacuole parasitophore pour évoluer vers le stade amastigote, l'activité *trans*-sialidase serait également impliquée dans ce processus.

Les séquences répétées du domaine LTR commun à beaucoup d'autres molécules de la superfamille de la *trans*-sialidase sont des motifs immunodominants, et sont la cible de l'essentiel de la réponse immunitaire précoce, prévenant en quelque sorte l'inhibition de l'activité catalytique au début de l'infection (Leguizamón *et al.*, 1994 et Buscaglia *et al.*, 1998). On trouve ainsi dans le sérum des patients chagasiques en phase aiguë des formes solubles et actives de *trans*-sialidase, qui pourraient être impliquées dans les manifestations de la maladie.

2.5. Applications de l'activité *trans*-sialidase

La *trans*-sialidase reste le seul exemple d'enzyme capable, dans des conditions physiologiques, de catalyser le transfert d'un monosaccharide sur un accepteur sans utiliser de nucléotides-sucres qui sont les coûteux donneurs des transférases. La réaction est réversible, et en conditions stœchiométriques un équilibre s'établit théoriquement pour 50% de produit sialylé, mais un excès de donneur permet un transfert pratiquement total (Scudder *et al.*, 1993). De plus, en dépit d'une stricte spécificité pour les liaisons α 2,3, elle utilise une grande variété de donneurs et d'accepteurs, contrairement aux sialyltransférases. On peut ainsi envisager des donneurs d'acides sialiques modifiés (Lee et Lee, 1994) pour synthétiser des analogues d'oligosaccharides, des donneurs micro- ou macromoléculaires et même des donneurs immobilisés sur support. La *trans*-sialidase a été employée avec succès pour resialyler des érythrocytes (Tomlinson *et al.*,

1992) et dans divers procédés synthétiques (Ito et Paulson, 1993, Vetere et Paoletti, 1996 et Lubineau *et al.*, 1997).

Travaux personnels

Position du travail dans le domaine

Les protéines recombinantes représentent de nouveaux espoirs en thérapies animale et humaine. Cependant, le développement et la commercialisation de ces molécules restent sous la contrainte d'une production généralement coûteuse. Les protéines recombinantes sont *a priori* plus sûres que des protéines extraites à partir d'une source naturelle, néanmoins, le lien soupçonné (mais réfuté par Ascherio *et al.*, 2001) entre la vaccination contre l'hépatite B (à l'aide d'un vaccin recombinant produit dans *Saccharomyces cerevisiae*) et des cas de sclérose en plaques illustre la nécessité d'un contrôle très strict de la qualité de ces protéines et de leurs effets biologiques. Notamment, la compréhension de plus en plus claire des rôles possibles des oligosaccharides montre que la glycosylation des protéines recombinantes thérapeutiques est un problème crucial qui complique considérablement leur développement pré-clinique.

Le choix d'un système d'expression doit, par conséquent, largement tenir compte des capacités de glycosylation des cellules hôtes (Jenkins *et al.*, 1996, pour revue).

Parmi les hôtes couramment utilisés, les bactéries, qui ne réalisent pas de glycosylation de type eucaryote, sont souvent exclues pour la production de glycoprotéines. Les levures synthétisent des structures hypermannosylées pouvant atteindre 150 résidus de mannose dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae*, plus courtes chez *Pichia pastoris* (pour revue, Gemmil et Trimble, 1999). Cette hypermannosylation est susceptible de diminuer l'activité biologique des molécules injectables et d'induire une réaction immunitaire. Les structures *N*-glycanniques associées aux glycoprotéines d'origine végétale sont dépourvues d'acides sialiques et, le plus souvent, de galactose terminaux, en outre elles contiennent des résidus de xylose et la fucosylation sur le résidu de GlcNAc du noyau est faite en $\alpha 1,3$ (Lerouge *et al.*, 1998). Ces deux structures inexistantes chez l'homme sont potentiellement allergéniques ou antigéniques (Garcia-Casado *et al.*, 1996). Les cellules de mammifères, phylogénétiquement plus proches de l'homme, ne constituent pourtant pas la solution : comme beaucoup de mammifères, les lignées de souris expriment une $\alpha 1,3$ -galactosyltransférase responsable de la synthèse de l'antigène de Galilli, qui est absent chez l'homme et les singes du nouveau monde (Oriol *et al.*, 1999). L'administration par injection d'une glycoprotéine portant ce déterminant est susceptible de déclencher un choc anaphylactique car les anticorps dirigés contre cette structure constitueraient 1% des anticorps humains (Galili, 1993). Un autre inconvénient des cellules de mammifères (notamment CHO ou

BHK) est la présence d'acide *N*-glycolylneuraminique (Neu5Gc). Absent des tissus humains normaux, ce composé constitue chez l'homme un antigène oncofœtal (Noguchi *et al.*, 1995 et Schauer et Kamerling, 1997). Même des cellules humaines en culture synthétisent des structures différentes de celles rencontrées *in vivo* : ainsi, l'érythropoïétine recombinante dans une lignée de cellules lymphoblastoïdes humaines présente des *N*-glycannes très différents de ceux portés par l'érythropoïétine urinaire humaine (Cointe *et al.*, 2000). Ce fait montre que les structures oligosaccharidiques sont le résultat d'un équilibre fragile entre de très nombreux paramètres qui ne sont pas nécessairement reproductibles *in vitro*.

Le système baculovirus-cellules d'insectes paraît intéressant pour son rendement, sa sécurité, et la relative facilité avec laquelle sont générés les vecteurs recombinants. Les structures glycaniques synthétisées sont certes plus courtes mais exemptes de structures "exotiques". Seule la fucosylation en α 1,3 sur le point d'attache pourrait être un obstacle, mais certaines lignées comme la lignée Sf9, qui est pour l'instant la seule lignée agréée par la FDA (Food and Drug Administration), en sont dépourvues. Les structures tronquées laissent donc envisager une possible "humanisation" de la glycosylation dans les cellules d'insectes. Dans l'idéal, cette stratégie doit permettre de contrôler précisément la glycosylation des protéines recombinantes et d'obtenir une bonne homogénéité.

Néanmoins, la voie de maturation des *N*-glycannes aboutissant à ces structures paucimannosidiques demeurait mal comprise lorsque nous avons entrepris ce travail et de nombreuses contradictions persistaient. **Avant de chercher à modifier les capacités de glycosylation des cellules de Lépidoptères, il nous a paru essentiel de définir les différentes étapes de ce processus.** Nous avons donc entrepris de rechercher des intermédiaires de ce métabolisme dans les cellules Sf9. L'utilisation d'inhibiteurs nous a permis de caractériser des intermédiaires clés de ce métabolisme et de montrer que ce sont les mêmes que chez les mammifères. Les divergences se situant dans les étapes terminales, il apparaît possible d'agir sur ces intermédiaires communs pour dévier la maturation vers la synthèse de *N*-glycannes de type complexe.

Les tentatives déjà rapportées de correction de la glycosylation dans les cellules d'insectes montrent que l'addition de glycosyltransférases suffit à étendre partiellement les capacités de glycosylation lorsque les donneurs correspondants sont présents. La glycosylation terminale et

tout particulièrement la sialylation est, elle, compliquée par l'absence du donneur CMP-Neu5Ac, observée par plusieurs auteurs. Plusieurs stratégies sont alors envisageables. La première serait de sialyer *in vitro* les glycoprotéines purifiées à l'aide d'une sialyltransférase et de CMP-Neu5Ac, mais le coût élevé de ce composé est difficilement compatible avec une production industrielle (Stanley *et al.*, 1992). Il est également possible d'ajouter d'autres gènes nécessaires à la synthèse et au transport du CMP-Neu5Ac. Le travail publié par Hollister et Jarvis (2001) suggère que les cellules de Lépidoptères expriment déjà quelques-unes de ces activités, ce qui est encore mal compris. Une autre stratégie est de copier une propriété de certains trypanosomes qui, incapables de synthétiser les acides sialiques, utilisent la *trans*-sialylation. Le parasite *Trypanosoma cruzi* possède en effet une *trans*-sialidase membranaire capable de sialyer des antigènes de sa surface aux dépens de glycoconjugués de l'hôte. **Notre but était d'exprimer la *trans*-sialidase à la surface des cellules d'insectes afin de mimer cette propriété unique du parasite.** L'enzyme recombinante est capable de sialyer des accepteurs galactosylés exogènes. Nos résultats montrent donc que la sialylation de glycoprotéines recombinantes dans le système baculovirus-cellules d'insectes grâce à la *trans*-sialidase est envisageable.

I. Etude métabolique de la voie de maturation des *N*-glycannes dans les cellules Sf9

1. Introduction

Lorsque nous avons entrepris ce travail, l'essentiel des connaissances sur les capacités de glycosylation des cellules d'insectes dérivait d'analyses structurales de glycoprotéines produites dans des vecteurs baculovirus. Si la grande majorité de ces études montraient que seules des structures de types oligo- ou paucimannosidique étaient synthétisées, il restait d'importantes contradictions. En effet, le cas du plasminogène humain recombinant dans plusieurs lignées cellulaires de lépidoptères (Davidson *et al.*, 1990 et Davidson et Castellino, 1991a et b), pour lequel les auteurs décrivent des *N*-glycannes de type complexe galactosylés et sialylés, suggère que les cellules d'insectes ont dans une certaine mesure la capacité de former des glycannes complets. Ces contradictions montrent toutefois qu'il est difficile de déduire un métabolisme d'études concernant des glycoprotéines particulières. De plus, il s'agit toujours de glycoprotéines synthétisées au cours d'une infection virale, où le métabolisme est profondément perturbé.

D'autres études ont consisté à rechercher des activités enzymatiques susceptibles d'intervenir dans la maturation des *N*-glycannes, prenant le cas des mammifères comme modèle. Comme discuté précédemment, les enzymes réticulaires, les mannosidases I et II golgiennes et la *N*-acétylglucosaminyltransférase I existent à des niveaux comparables à celles des cellules de mammifères, alors qu'il n'existe pas d'activités *N*-acétylglucosaminyltransférase II, β 1,4-galactosyltransférase ni sialyltransférase. En outre, une nouvelle glucosaminidase membranaire a été décrite (Altmann *et al.*, 1995 et Wagner *et al.*, 1996a), et il est tentant de penser qu'elle est responsable de l'élimination du résidu GlcNAc pour former les espèces de type $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, comme c'est le cas chez les végétaux (Vitale et Chrispeels, 1984). Néanmoins, des voies alternatives ont été décrites dans certains systèmes (Yamashita *et al.*, 1983 et Chui *et al.*, 1997) et, en l'absence de données métaboliques, rien ne permet de les exclure pour les cellules d'insectes.

Dans ce travail, nous avons voulu apporter un éclairage supplémentaire en examinant, par des marquages métaboliques, le processus de maturation de l'ensemble des *N*-glycannes dans des cellules d'insectes Sf9 non infectées.

Les inhibiteurs de la glycosylation ou du trafic intracellulaire ont contribué à la compréhension des voies de glycosylation et de leur topologie dans les cellules de mammifères. Chez les cellules d'insectes, les seules informations obtenues avec ces inhibiteurs ont concerné des changements de mobilité ou de sensibilité à l'endoglucosaminidase H des glycoprotéines recombinantes.

Le premier inhibiteur utilisé, la castanospermine, bloque les glucosidases du reticulum endoplasmique (Pan *et al.*, 1983). Dans les cellules d'insectes, la castanospermine entraîne un changement de mobilité électrophorétique des glycoprotéines (Jarvis *et al.*, 1990 et Jarvis et Garcia, 1994). La swainsonine, en empêchant l'action de la mannosidase II golgienne (Tulsiani *et al.*, 1982), conduit à la formation de *N*-glycannes de type hybride. Jarvis *et al.* (1997) et Ren *et al.* (1997) ont montré que la mannosidase II des cellules Sf9 était également sensible à la swainsonine. Outre ces inhibiteurs de glycosylation proprement dits, des inhibiteurs du fonctionnement de l'appareil de Golgi peuvent fournir des informations sur la glycosylation et sa compartimentation (Dinter et Berger, 1998). Ainsi, la monensine, un inhibiteur de la sécrétion et du trafic intervésiculaire (Tartakoff *et al.*, 1978), a été utilisée dans cette étude. En présence de monensine, les différents auteurs observent un gonflement des saccules golgiens et Cecchelli *et al.* (1986) constatent notamment une entrée accrue de nucléotides-sucres, ce qui est susceptible d'entraîner des changements dans la glycosylation. Les cellules d'insectes voient également leur sécrétion bloquée en présence de monensine (Gunne et Steiner, 1993).

Des marquages métaboliques des *N*-glycannes en présence de ces inhibiteurs nous ont ainsi permis de caractériser des intermédiaires clés de la voie de maturation des *N*-glycannes dans des cellules Sf9.

2. Résultats

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *Glycobiology*.

Article I:

Marchal, I., Mir, A.-M., Kmiécik, D., Verbert, A. and Cacan, R. (1999)

Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of *N*-glycans synthesized by insect cells: a metabolic study with Sf9 cell line.

Glycobiology 9(7), 645-54.

Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of N-glycans synthesized by insect cells: a metabolic study with Sf9 cell line

Ingrid Marchal, Anne-Marie Mir, Daniel Kmiécik, André Verbert and René Cacan¹

Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 111 du CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received on July 20, 1998; revised on January 30, 1999; accepted on February 1, 1999

¹To whom correspondence should be addressed

The most frequent type of N-glycan synthesized by lepidopteran Sf9 cells appears to be fucosylated Man₃GlcNAc₂, and this has been a limitation for a large scale production and utilization of therapeutic glycoproteins in cultured insect cells. The current knowledge of the protein glycosylation pathway derived from structural studies on recombinant glycoproteins expressed by using baculovirus vectors. In this work we provide more direct evidence for the sequential events occurring in the processing of endogenous N-glycoproteins of noninfected Sf9 cells. By metabolic labeling with radioactive mannose, we characterized the glycan structures which accumulated in the presence of processing inhibitors (castanospermine and swainsonine) and in the presence of an intracellular trafficking inhibitor (monensin). We thus demonstrated that from the glycan precursor Glc₃Man₉GlcNAc₂ to GlcNAc-Man₅(Fuc)GlcNAc₂ intermediate, the processing pathway in Sf9 cells paralleled the one demonstrated in mammalian cells. By using monensin, we demonstrated the formation of Man₃(Fuc)GlcNAc₂ from GlcNAcMan₃(Fuc)GlcNAc₂, a reaction which has not been described in mammalian cells. Our results support the idea that the hexosaminidase activity is of physiological relevance to the glycosylation pathway and is Golgi located.

Key words: glycoproteins/ insect cells/N-linked oligosaccharides/ processing inhibitors

Introduction

Lepidopteran insect cells are used routinely as hosts for recombinant glycoprotein expression by using baculovirus vectors. The major properties of the baculovirus system include high expression levels and the ability of insect cell lines to synthesize N-glycans. But the major glycans bound to recombinant N-glycoproteins produced in such a system are unsuitable for use in human therapy.

The N-glycosylation pathway in higher eukaryotes starts by the transfer *en bloc* in the rough endoplasmic reticulum (ER) of a tetradecasaccharide (Glc₃Man₉GlcNAc₂) from a lipid intermediate (oligosaccharide-PP-Dol) to an Asn residue in the Asn-X-Ser/Thr consensus sequence of a nascent protein. This process is immediately followed by sequential deglycosylation steps. The Man₈GlcNAc₂-protein is the key structure which leaves the ER

to the Golgi apparatus. This oligomannoside-type glycoprotein is further processed in the different Golgi stacks, being trimmed by mannosidase I producing a Man₅GlcNAc₂ structure. Following the addition of a single GlcNAc residue by GlcNAc transferase I (GnTI), two mannose residues are removed by mannosidase II. This constitutes a prerequisite step for elongation by GlcNAc transferase II (GnTII), galactosyl- and sialyltransferases to give a variety of complex-type glycans (for a review, see Kornfeld and Kornfeld, 1985).

By contrast, although the occurrence of Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol has been demonstrated (Quesada Allue and Belocopitow, 1978; Butters *et al.*, 1981; Sagami and Lennarz, 1987; Parker *et al.*, 1991), the processing of N-glycans in insect cells remains poorly defined. Taking the processing occurring in mammalian cells as a model, some enzymatic activities have been detected and in some cases, cDNAs have even been isolated. Several lines of evidence have shown that these cells possess mannosidase I (Davidson *et al.*, 1991; Kerscher *et al.*, 1995; Ren *et al.*, 1995; Kawar *et al.*, 1997), mannosidase II (Altmann and März, 1995; Jarvis *et al.*, 1997; Ren *et al.*, 1997), GnTI and GnTII (Altmann *et al.*, 1995; Velardo *et al.*, 1993), and fucosyltransferase (Staudacher *et al.*, 1992). Furthermore, some information on insect cell processing has been provided by structural studies on foreign recombinant proteins, suggesting that they can produce glycoproteins with galactose and sialic acid (Davidson *et al.*, 1990; Davidson and Castellino, 1991a,b; Ogonah *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1997).

The only evidence for the processing pathway have been obtained by the effects of inhibitors on electrophoretic mobility and/or endoglucosaminidase H sensitivity of glycoproteins (Jarvis and Summers, 1989; Jarvis *et al.*, 1990; Jarvis and Garcia, 1994). In this report we provide a more direct analysis by looking at the effect of glycosidase inhibitors (castanospermine, swainsonine) and an intracellular trafficking inhibitor (monensin) on the glycans themselves. This allowed us to demonstrate *in vivo* the trimming pathway leading from the glycan precursor Glc₃Man₉GlcNAc₂, to the final product, Man₃(Fuc)GlcNAc₂.

Results

Labeling of Sf9 cells with 2-[³H]Man

Sf9 cells were incubated under standard conditions in the presence of 2-[³H]Man. Figure 1 represents HPLC analyses of the oligosaccharide-PP-Dol and glycoprotein fractions. As has already been demonstrated, the major species occurring in lipid intermediates was Glc₃Man₉GlcNAc₂ (Figure 1A). The pattern obtained with glycoproteins (Figure 1B,C) revealed Glc₁Man₉GlcNAc₂, Man₉GlcNAc₂ and Man₈GlcNAc₂, which have been described in many biological models to originate from Glc₃Man₉GlcNAc₂ by a trimming located in the rough ER. Besides these oligosaccharides, a species migrating like Man₃GlcNAc₂ could be detected. The substrate product relationships between the radioactivity bound to oligosaccharide-PP-Dol and glycoproteins is shown Figure 2. When the labeling was

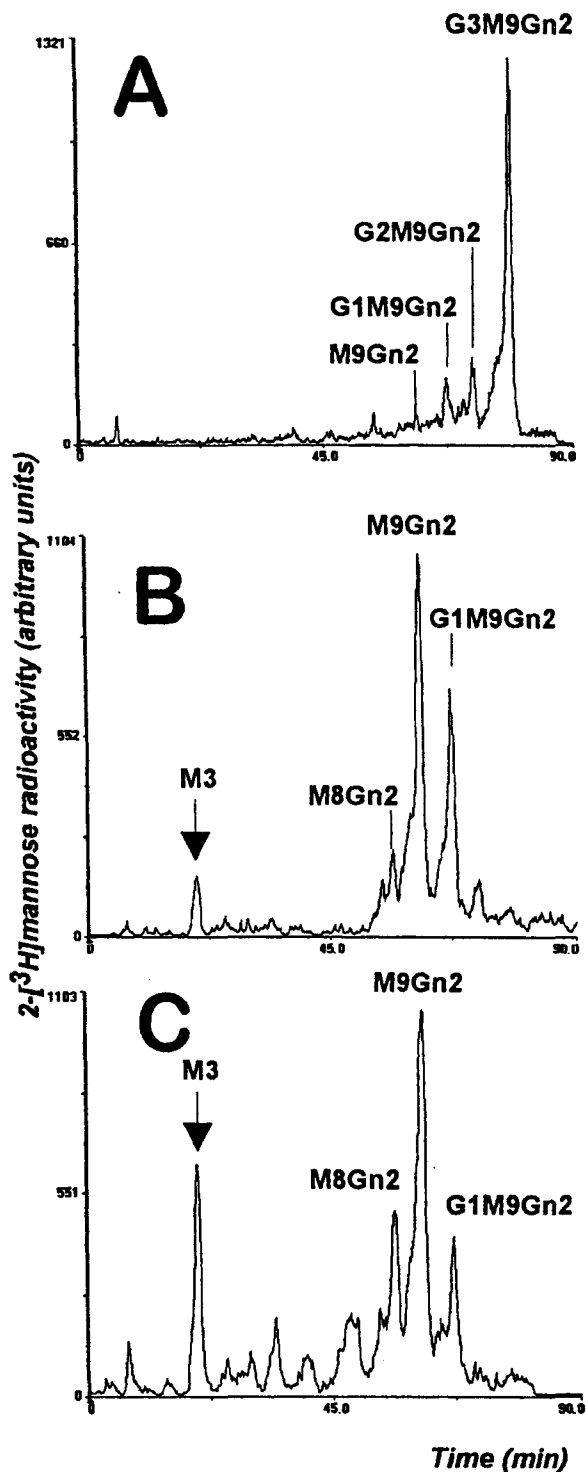


Fig. 1. Metabolic labeling of Sf9 cells with 2-[³H]mannose. Sf9 cells were labeled for 30 or 120 min with 2-[³H]mannose under the conditions described under *Materials and methods*. (A) shows the HPLC analysis of glycan moieties linked to oligosaccharides-PP-Dol after 120 min labeling. (B) and (C) show the HPLC analysis of glycan moieties linked to glycoproteins after 30 and 120 min labeling, respectively. G3M9Gn2, G2M9Gn2, and G1M9Gn2 indicate oligomannoside species possessing two GlcNAc and nine mannose residues with three, two, or one glucose residues, respectively. M9Gn2 and M8Gn2, indicate oligomannoside species possessing two GlcNAc residues and nine or eight mannose residues, respectively. M3 indicates the elution time of an oligomannoside possessing three mannose residues and two GlcNAc residues.

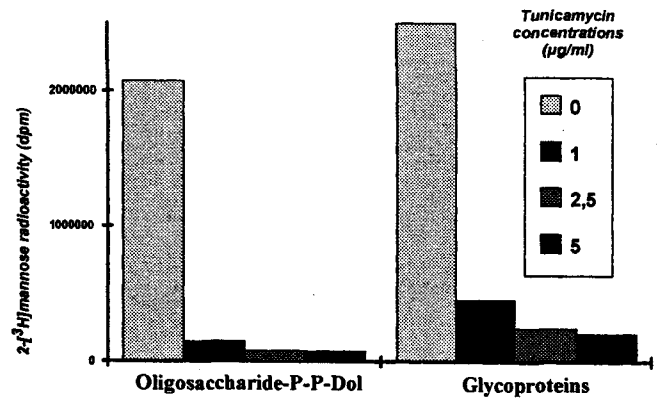


Fig. 2. Effect of tunicamycin on the incorporation of 2-[³H]mannose on oligosaccharide-PP-Dol and on glycoproteins. Sf9 cells were labeled with 2-[³H]mannose under the conditions described in *Materials and methods* for 60 min in the absence (0) or in the presence of various concentrations (1, 2.5, and 5 µg/ml) of tunicamycin.

performed in the presence of tunicamycin (an inhibitor of the first step in the synthesis of oligosaccharide-PP-Dol), a 97% inhibition was observed onto lipid intermediates and a 90% inhibition onto glycoproteins. This indicated that $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ from lipid intermediates was the precursor of glycan species linked to proteins. It could be assumed that the product migrating as $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ was the end-product of the trimming of glycoproteins in Sf9 cells, since its quantity increased with the incubation time (Figure 1B,C) and chase experiments (not shown) indicated that it was formed at the expense of larger species.

Since most of the oligosaccharide structures synthesized by Sf9 cells have been shown to be fucosylated, we investigated the fucosylation status of the product migrating as $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ species. In an attempt to specifically label fucosylated compounds, Sf9 cells were incubated with 6-[³H]Fuc. Whatever the incubation time from 30 min to 2 h, no significant radioactivity was detected either in the lipid or in the glycoprotein fraction. However, when the product migrating as $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ prepared from mannose-labeled glycoproteins was acid-treated under conditions designed to release fucosyl residues or treated with α -fucosidase from bovine epididymis, radioactive fucose could be detected (Figure 3). Indeed, as for many cells, the major origin of GDP-L-fucose is GDP-D-mannose (Ginsburg, 1961) rather than exogenous fucose which accounts for less than 10% of the GDP-L-fucose intracellular pool (Yurchenko and Atkinson, 1977). In fact, using isocratic conditions, $\text{Man}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$ could be separated from $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, as demonstrated by cochromatography analysis of the Man_3 species obtained before and after acid treatment (Figure 3D). The facts that the enzyme from bovine epididymis cleaves $\alpha 1\pm 6$ fucose residues more efficiently than other α -fucose linkages and that the $\alpha 1\pm 3,4$ fucosidase from almond meal was inefficient in releasing fucose (data not shown), demonstrated that fucose residues were $\alpha 1\pm 6$ linked.

To study the sequential events leading from $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ to $\text{Man}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$, we used processing and intracellular trafficking inhibitors which have been shown to impair some key reactions in the mammalian N-glycosylation pathway.

Effect of castanospermine

Figure 4 represents the pattern obtained on glycoproteins when the labeling was performed under standard conditions in the presence of 150 µg/ml castanospermine (Figure 4A), an inhibitor

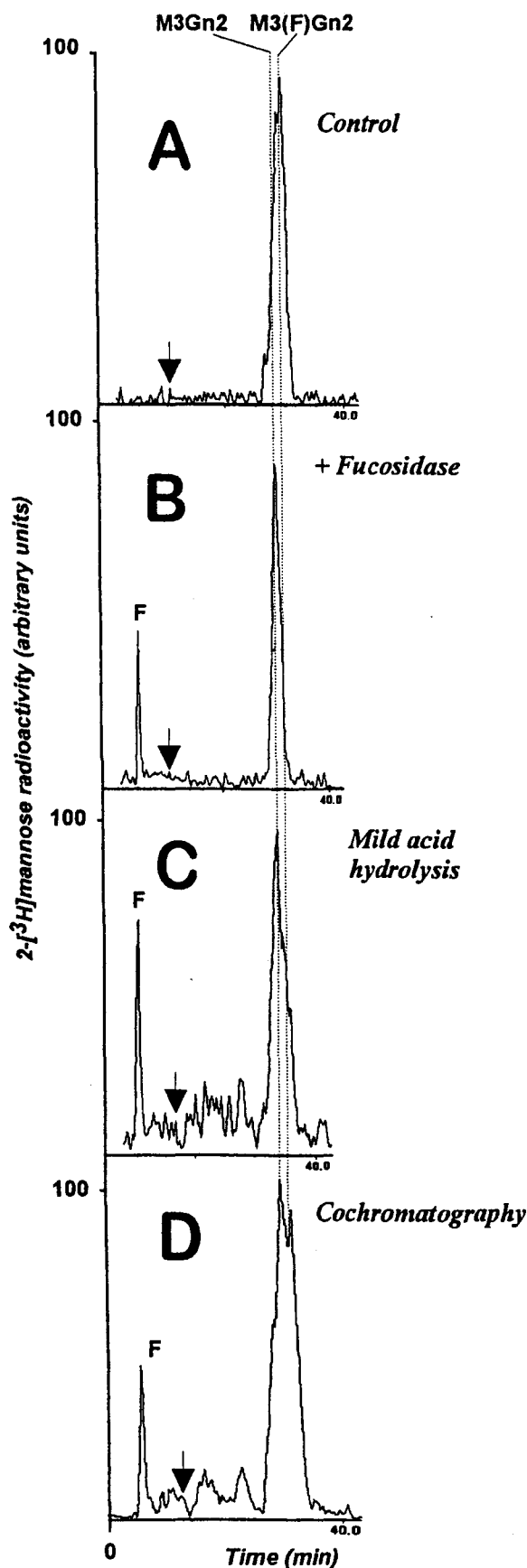


Fig. 3. Fucosylation status of metabolically labeled $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ species. Sf9 cells were labeled for 120 min with 2- ^3H mannose under the conditions described under *Materials and methods*. The "M3" (see Figure 1) species was isolated by preparative HPLC from the labeled glycans of the glycoprotein fraction. The isolated material was analyzed by HPLC using isocratic conditions and two successive columns. Control (A) indicates the migration of "M3" species isolated from glycoproteins. This material was treated by α -fucosidase or submitted to mild acid hydrolysis as described under *Materials and methods* (B and C, respectively). A cochromatography of acid treated material with the control was also performed (D). M3Gn2 indicates the elution time of an oligomannoside possessing three mannose residues and two GlcNAc residues. M3(F)Gn2 indicates the elution time of an oligomannoside possessing three mannose residues and two GlcNAc residues, the terminal reducing one being fucosylated. F, Free fucose; arrow indicates the elution position for the free mannose.

of rough ER glucosidases I and II (Pan *et al.*, 1983). Compared to the control without castanospermine (Figure 1B,C), the $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ species was observed as expected, but also the final $\text{Man}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$ was lacking. The glycan moieties observed on proteins were mainly glucosylated, as demonstrated by the action of α -mannosidase which led to the formation of a major $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ peak (Figure 4B), since the glucosylated $\alpha 1,3$ branch of the oligosaccharides was protected from the digestion by the exoglycosidase. It has been well described (Kobata, 1976) that the $\text{Man}\alpha 1,6$ in the trimannosyl core of the N-linked sugar chain was not cleaved by jack bean α -mannosidase digestion, unless the $\text{Man}\alpha 1,3$ of the core was removed. Thus, the α -mannosidase treatment of $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ produced $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. In fact the pattern obtained after α -mannosidase digestion (Figure 4B) was a mixture of different Man_5 oligomannosides with additional 1, 2, or 3 glucose residues as they comigrated with authentic $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, and $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ obtained from Man-P-Dol deficient cell line B3F7 (see *Material and methods*). The presence of species having a size higher than $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (20% of the radioactivity) after α -mannosidase digestion was presumably due to incomplete hydrolysis. Thus, as in mammalian cells, the processing of N-glycans starts by the removal of glucose residues by the action of castanospermine-sensitive glucosidases. Similar conclusions have been drawn from SDS-PAGE mobility and endoglucosaminidase H sensitivity changes in glycoproteins after castanospermine treatment of the cells (Jarvis *et al.*, 1990; Jarvis and Garcia, 1994).

Characterization of an hexosaminidase-sensitive intermediate accumulated in the presence of swainsonine

Swainsonine is known to impair the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of mammalian Golgi mannosidase II (Tulsiani *et al.*, 1982). It is also known that Sf9 mannosidase II is sensitive to swainsonine (Jarvis *et al.*, 1997; Ren *et al.*, 1997). Labeling of Sf9 cells under standard conditions in the presence of 5 μM swainsonine inhibits the formation of $\text{Man}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$ as shown in figure 5 (preparative HPLC). Under these conditions, intermediates are observed between the expected $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ species and Glc_1Man_9 -, Man_9 -, and $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ species. Among these peaks, the peak A, migrating as $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ was the only one sensitive to N-acetyl- β -hexosaminidase, leading to $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (see as control, the behavior of $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ species) indicating the presence of $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ species. Whatever the incubation time, a part of the material contained in peak A was not affected by the action of hexosaminidase, suggesting also the presence of $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (25% of the

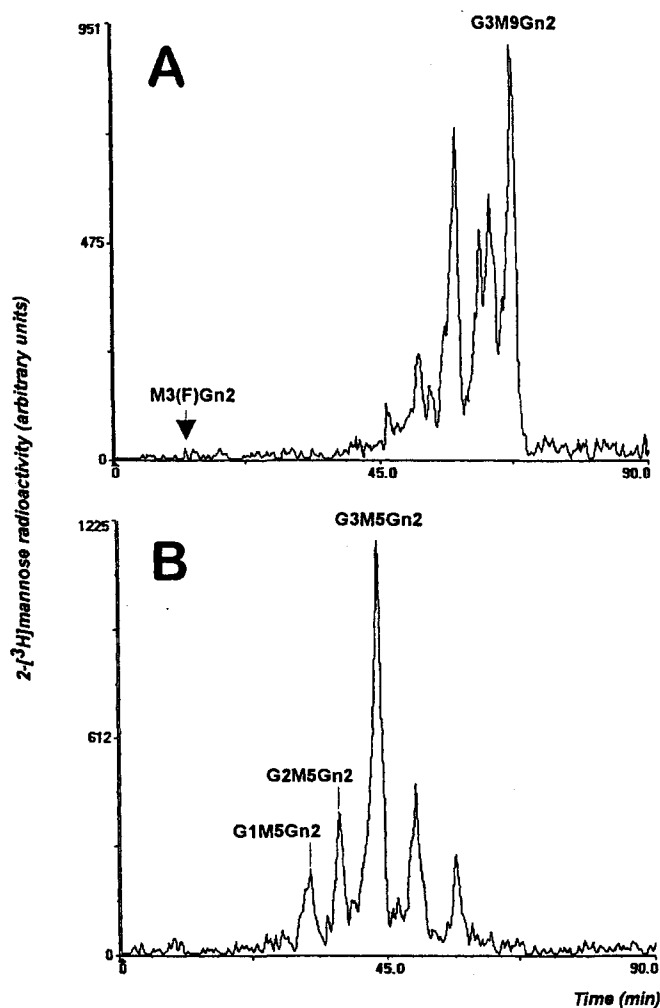


Fig. 4. Effect of castanospermine on the pattern of oligomannosides bound to glycoproteins. Sf9 cells were labeled with 2-[³H]mannose under the conditions described in *Materials and methods* for 60 min in the presence of 150 µg/ml castanospermine. (A) represents the HPLC analysis of glycan moieties bound to the glycoprotein fraction. (B) shows the same material after digestion with α -mannosidase and purification on Biogel P2. G3M9Gn2 indicates oligomannoside species possessing two GlcNAc, nine mannose, and three glucose residues. G3M5Gn2, G2M5Gn2, and G1M5Gn2 indicate oligomannoside species possessing two GlcNAc and five mannose residues with three, two, or one glucose residues, respectively. M3(F)Gn2 indicates the elution time of an oligomannoside possessing three mannose residues and two GlcNAc residues, the terminal reducing one being fucosylated.

radioactivity). Peak A was incompletely hydrolyzed by α -mannosidase, leading to a product (peak B) which has been identified as GlcNAcMan₃GlcNAc₂ by its susceptibility to hexosaminidase and resistance to jack bean α -mannosidase (see also Figure 7, peak B). Indeed, jack bean α -mannosidase was not able to cleave a single α 1,6-linked mannose from the core β -mannose as it has been clearly demonstrated for GlcNAcMan₃GlcNAc₂ isolated from bovine rhodopsin (Liang *et al.*, 1979). In contrast peak A was totally hydrolyzed by sequential treatment with hexosaminidase and jack bean α -mannosidase (Figure 5). This demonstrated that peak A contained also GlcNAcMan₅GlcNAc₂ species.

As this structure has been demonstrated in mammalian cells to be an acceptor substrate for the core α 1,6-fucosyltransferase (Wilson *et al.*, 1976), the presence of fucosyl residue was

checked. Both trifluoroacetic acid hydrolysis (not shown) and bovine epididymis α -fucosidase digestion (Figure 5) led to the release of radioactive fucose. This confirmed that, as observed above, radioactive fucose was synthesized by Sf9 cells from radioactive GDP-Man. Thus, three intermediates accumulated in the presence of swainsonine were present in peak A: Man₆GlcNAc₂, GlcNAcMan₅GlcNAc₂, and GlcNAcMan₅(Fuc)GlcNAc₂.

Effect of monensin

Monensin has been used to obtain information about the terminal steps of the glycosylation process. This carboxylic ionophore has been shown to impede the exit of secretory and membrane glycoproteins (Tartakoff and Vassalli, 1978), to lead to the dilation of Golgi vesicles, and to enhance the accumulation of sugar nucleotides (Cecchelli *et al.*, 1986), and also to be effective on insect cells as shown by the blockage of secretion of an immune protein from insect fat body cells (Gunne and Steiner, 1993). When Sf9 cells were incubated under standard conditions in the presence of 10 µM monensin, the level of incorporation of 2-[³H] mannose on glycoproteins was decreased to 20% of the control, indicating that the N-glycosylation process was disturbed. Figure 6A shows that in the presence of monensin, the synthesis of proteins was greatly affected as demonstrated by a 97% decrease of labeled methionine incorporation. When the mannose labeled glycoproteins were analyzed by SDS-PAGE, it clearly appeared that the mobility of glycoproteins labeled in the presence of monensin was different from those labeled in the control without monensin (Figure 6B). These results indicated that newly synthesized glycoproteins are only weakly labeled when cells were incubated in the presence of the inhibitor. In Figure 7 is reported the HPLC analysis of the glycan moieties bound to proteins synthesized under these conditions. Relative to the final product Man₃(Fuc)GlcNAc₂, the radioactivity incorporated in rough ER specific species (Glc₁Man₉-, Man₉-, and Man₈GlcNAc₂) was low. More interesting was the presence of a new intermediate, referred to as peak B, migrating as Man₄GlcNAc₂. Fucose was released by trifluoroacetic acid hydrolysis of the two isolated peaks, demonstrating that these two oligosaccharides are fucosylated. It is worth mentioning that defucosylation led to a loss of radioactivity of the defucosylated material, indicating a poor incorporation of radioactive mannose residues due to low protein synthesis. This result is in agreement with our previous observations (Figure 6 and D. Jarvis, personal communication) that monensin dramatically inhibited overall protein synthesis. Thus, the poor mannose labeling reflected inhibition of protein synthesis and the observed labeling resulted mainly from fucosylation of nonlabeled, previously synthesized, glycoprotein acceptors, retained in subterminal Golgi compartments as an effect of traffic inhibition by monensin. This is demonstrated by kinetic studies of incorporation of the radioactivity from 2-[³H] mannose labeling onto glycoprotein acceptor in the presence or in the absence of monensin (Figure 6C). In the absence of monensin the incorporation of 2-[³H] mannose was linear up to 6 h, but in the presence of monensin the incorporation reached a plateau at 2 h, demonstrating the glycosylation of preexisting structures which are blocked in the secretion pathway. As fucose was the major radioactive sugar incorporated in the presence of monensin (Figure 7) it can be assumed that the material labeled in the presence of monensin was trapped in fucosyltransferase containing vesicles, i.e., Golgi complex. Compared to Man₃(Fuc)GlcNAc₂, peak B was susceptible to N-acetyl- β -hexosaminidase digestion leading to a product migrating as Man₃(Fuc)GlcNAc₂, indicating that the substrate was

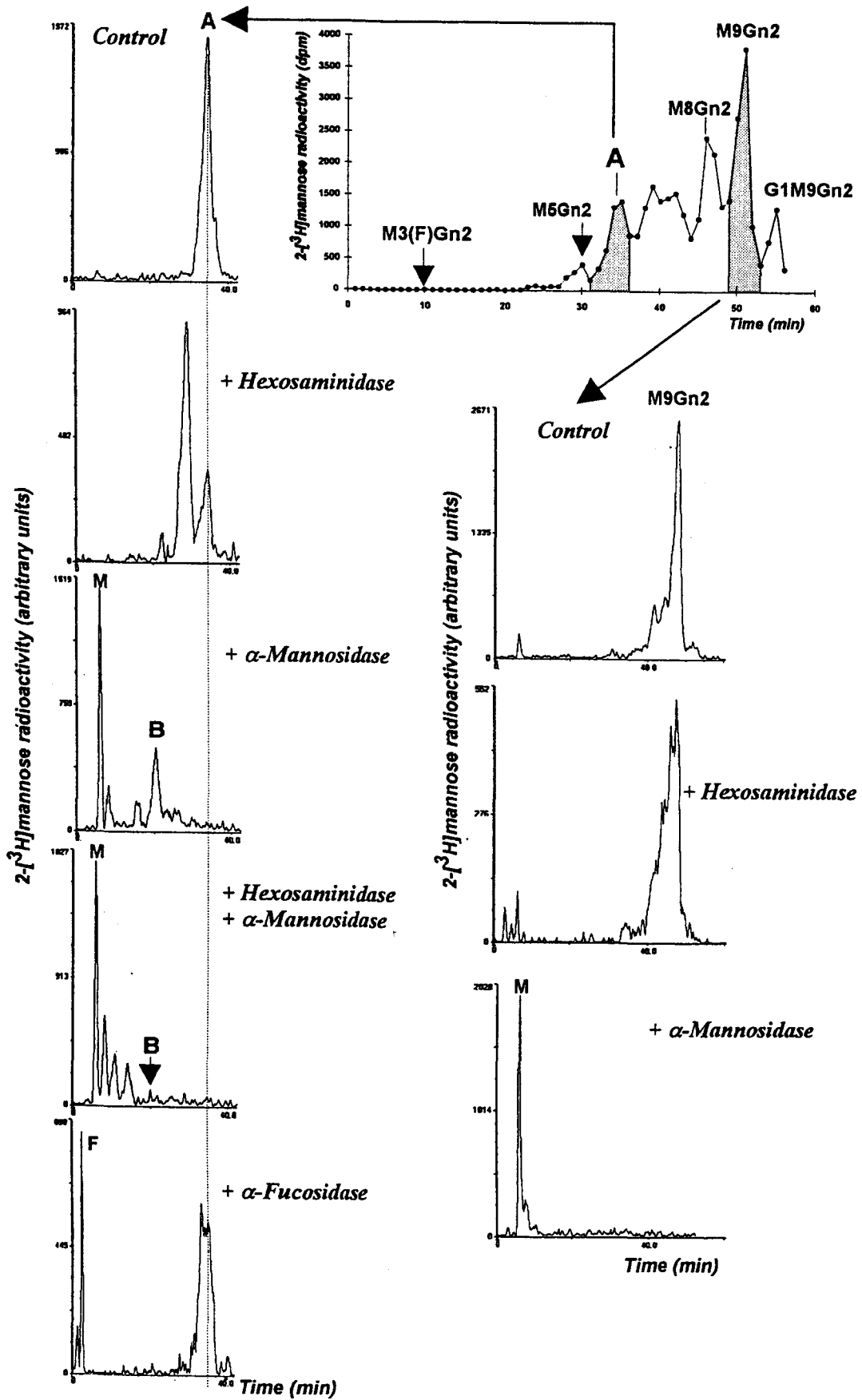


Fig. 5. Effect of swainsonine on the processing of glycans bound to glycoproteins. Sf9 cells were labeled with 2- ^{3}H mannose under the conditions described in *Materials and methods* for 60 min in the presence of 5 μM swainsonine. The oligosaccharides obtained after PNGase digestion of glycoproteins were isolated by preparative HPLC (hatched peaks). The isolated peak A and $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ were analyzed before (Control) and after hexosaminidase or α -mannosidase treatment in the conditions described in materials and methods. Peak A was also successively submitted to hexosaminidase and to α -mannosidase. It was also treated with α -fucosidase. G1M9Gn2 indicates oligomannoside species possessing two GlcNAc, nine mannose, and one glucose residues. M9Gn2, M8Gn2, and M5Gn2 indicate oligomannoside species possessing two GlcNAc residues and nine, eight, or five mannose residues, respectively. M3(F)Gn2 indicates the elution time of an oligomannoside possessing three mannose residues and two GlcNAc residues, the terminal reducing one being fucosylated. F, Free fucose; M, free mannose; peak B has been identified as $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ species.

$\text{GlcNAcMan}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$. As expected $\text{Man}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$ was totally digested by α -mannosidase, releasing both low labeled free mannose and fucose labeled $\text{Man}_1(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$. As shown in Figure 7, the migration of peak B was not affected by jack bean α -mannosidase treatment. This is in agreement with the structure we proposed: $\text{GlcNAcMan}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$, which has been demonstrated, as mentioned above, not to be susceptible to jack bean α -mannosidase digestion (Kobata, 1976; Liang *et al.*, 1979).

Conclusions

So far, the different steps of the N-glycan processing pathway in insect cells have been deduced by analogy to mammalian systems

either from structural studies of baculovirus expressed recombinant glycoproteins (Hsu *et al.*, 1997) or from the detection of glycosyltransferases and glycosidases. In this work, using metabolic labeling with 2- ^{3}H Man of non infected Sf9 cells we were able to demonstrate *in vivo* the sequential events of N-glycoprotein processing, leading from a $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ precursor to the $\text{Man}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$ final product. The newly synthesized, labeled glycans were isolated from the bulk of the cell glycoproteins, making the pattern more relevant of major events than when glycans were studied from a single exogenous glycoprotein. More important is to note that in our case, the insect cell glycosylation process was not disturbed, in contrast to what was observed in the baculovirus infection. Indeed, highly

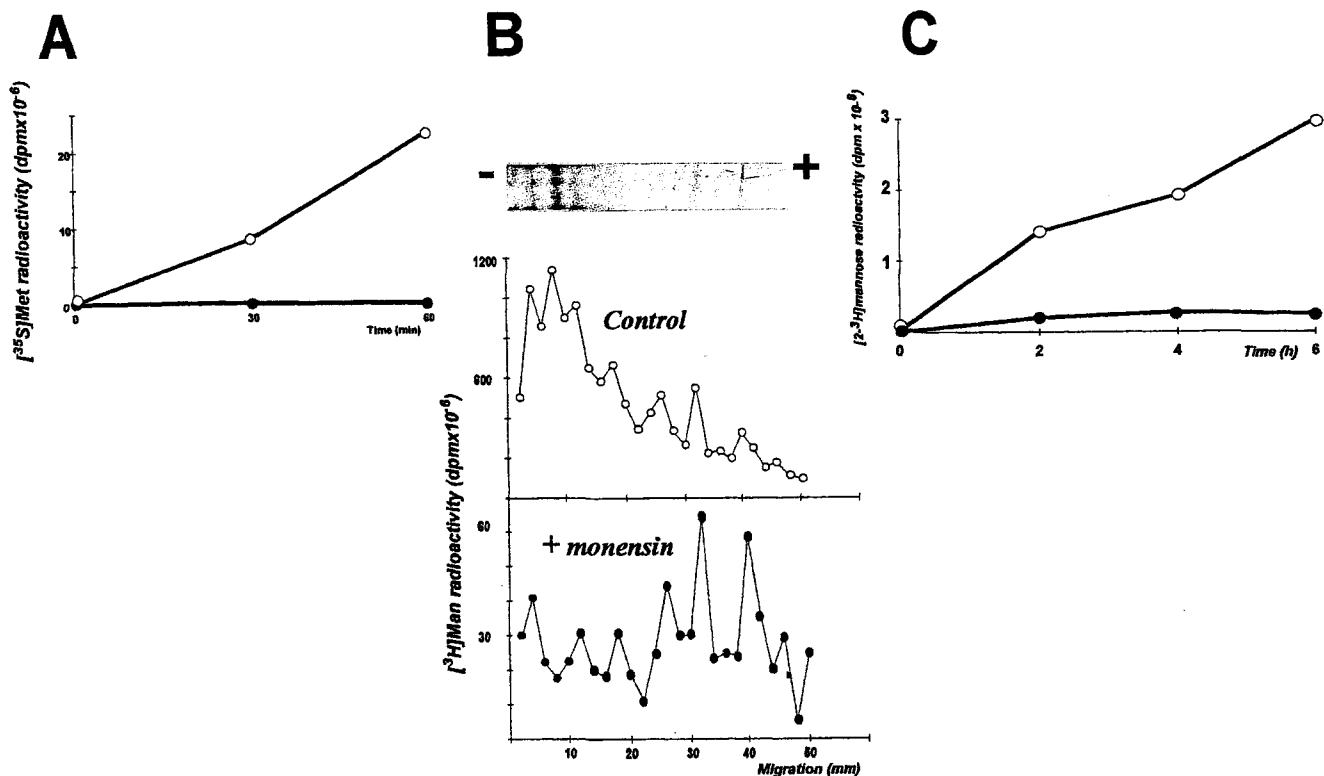


Fig. 6. Effect of monensin on protein synthesis, on the pattern of labeled glycoproteins and on radioactive incorporation onto glycoprotein after labeling with 2- ^{3}H mannose. Sf9 cells were labeled with ^{35}S Met and ^{35}S Cys mixture under the conditions described in *Materials and methods* for 15 min in the absence (open circles) or in the presence (solid circles) of 10 μM monensin. After precipitation and filtration, the radioactivity of the acido-precipitable material was determined by liquid scintillation (A). For electrophoresis, cells were labeled for 60 min with 2- ^{3}H mannose under the conditions described in *Materials and methods* in the absence (control) or in the presence (+ monensin) of 10 μM monensin. After lysis in the presence of 1% Triton X-100, the samples were run on an SDS-PAGE gel. Autoradiography was performed for the control. For quantification of the radioactivity, the proteins were transferred from the gel onto nitrocellulose membranes. The membranes were cut into 2 mm fractions along the electrophoretic path. The radioactivity of each fraction was determined by liquid scintillation counting (B). For the kinetic analysis after labeling with 2- ^{3}H mannose (C), Sf9 were labeled under the conditions described in *Materials and methods* for 2, 4, or 6 h in the absence (open circles) or in the presence (solid circles) of 10 μM monensin. After sequential extraction the radioactivity of the protein pellet was measured by liquid scintillation.

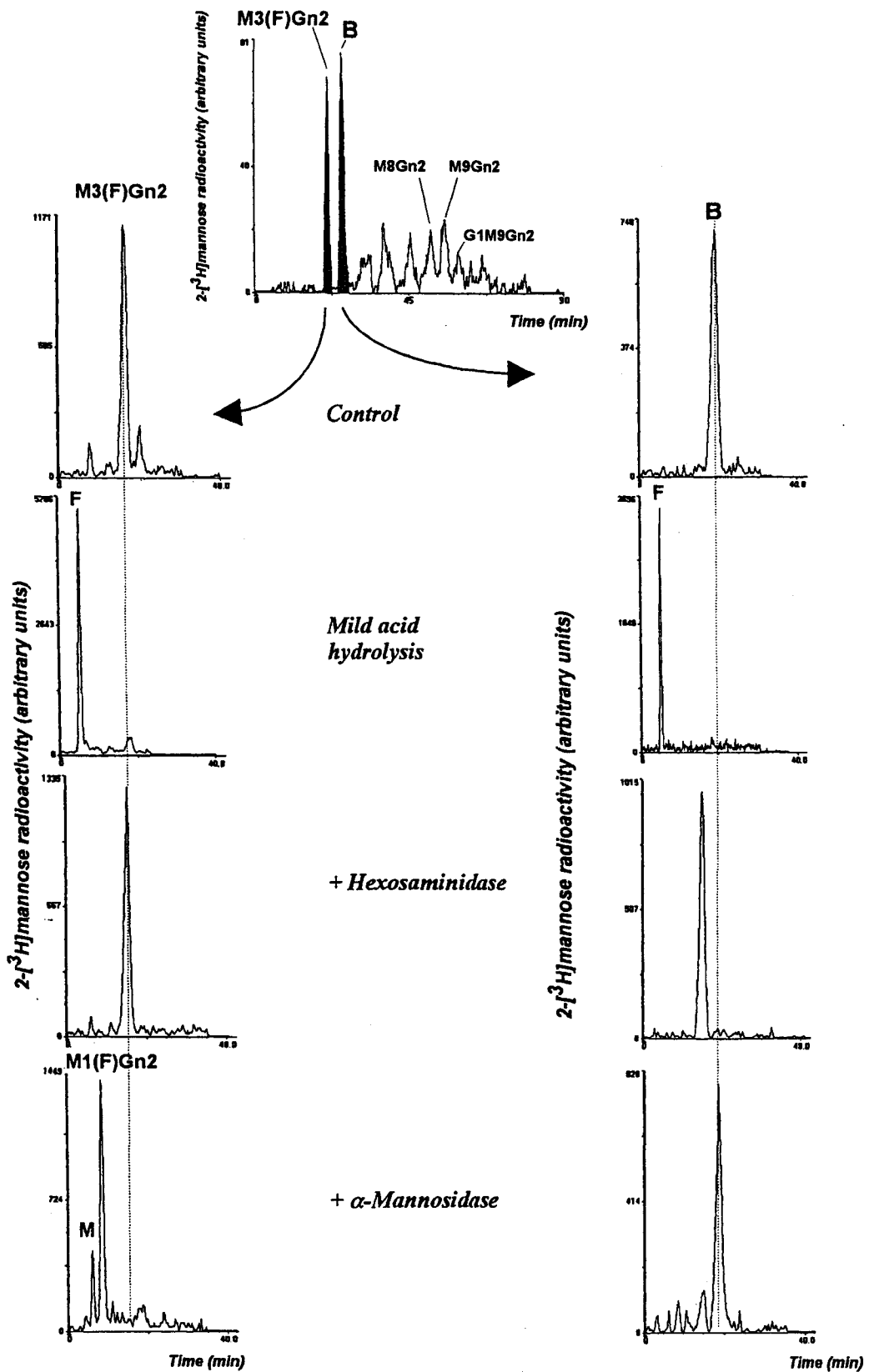


Fig. 7. Effect of monensin on the pattern of oligomannosides bound to glycoproteins. Sf9 cells were labeled with 2-[³H]mannose under the conditions described in *Materials and methods* for 30 min in the presence of 10 μ M monensin. The oligosaccharides obtained after PNGase digestion of glycoproteins were isolated by preparative HPLC (hatched peaks). The isolated Man3(F)Gn2 and peak B were analyzed before (Control) and after mild acid hydrolysis, hexosaminidase, and jack bean α -mannosidase treatments under the conditions described in *Materials and methods*. G1M9Gn2 indicates oligomannoside species possessing two GlcNAc, nine mannose, and one glucose residues. M9Gn2 and M8Gn2 indicate oligomannoside species possessing two GlcNAc residues and nine or eight mannose residues, respectively. M3(F)Gn2 and M1(F)Gn2 indicate oligomannosides possessing two GlcNAc residues, the terminal reducing one being fucosylated and three or one mannose residues, respectively. F, Free fucose; M, free mannose.

modified glycosylation of recombinant human plasminogen expressed in baculovirus system during infection has been reported by Davidson and Castellino (1991a,b).

Use of castanospermine, swainsonine, and monensin allowed us to identify metabolic intermediates similar to the ones observed in mammalian cells: glucosylated species in the case of inhibition of glucosidases, $\text{GlcNAcMan}_5(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$ as a consequence of mannosidase II inhibition by swainsonine, and $\text{GlcNAcMan}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$ which accumulated in the presence of monensin. The jack bean α -mannosidase specificity strongly suggests the following structure for this latter compound: $\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,3(\text{Man}\alpha 1,6)\text{Man}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4(\text{Fuc}\alpha 1,6)\text{GlcNAc}$. These observations are in good agreement with the occurrence of mannosidase I (Davidson *et al.*, 1991; Kerscher *et al.*, 1995; Ren *et al.*, 1995; Kawar *et al.*, 1997), GnTI (Altmann *et al.*, 1993; Velardo *et al.*, 1993), mannosidase II (Altmann and März, 1995; Jarvis *et al.*, 1997; Ren *et al.*, 1997) and fucosyltransferase activities (Staudacher *et al.*, 1992). A low GnTII activity has been measured by Altmann *et al.* (1993), but we could not detect significant amounts of products bearing a GlcNAc residue bound to the $\alpha 1,6$ core mannose, although their presence in low quantities could not be excluded.

Compared to mammalian cells, the difference of N-glycan processing in Sf9 cells is the removal of the GlcNAc residue previously transferred by GnTI. In fact, an unusual, membrane-bound β -N-acetylglucosaminidase activity has been reported by Altmann *et al.* (1995) and proposed to be involved in the last step of N-glycans processing. Our results support the idea that this enzymatic activity is of physiological relevance to the glycosylation process and is Golgi-located. In fact in the presence of monensin which is known to block vesicular trafficking between Golgi stacks, we observed accumulation of both $\text{GlcNAcMan}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$ species and $\text{Man}_3(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$ species. This indicates that the β -N-acetylglucosaminidase activity must be located in Golgi vesicles that are different from the ones where are located the previous steps of the processing. Figure 8 proposes a scheme of the processing of N-glycoproteins in Sf9 cells based on our observations. It is interesting to note that when looking at the glycosylation pattern of recombinant glycoprotein produced in the baculovirus expression system, a larger variety of structures can be detected (oligo- and paucimannosidic, hybrid, and complex types). This reinforces the idea that baculovirus infection greatly affects the glycosylation pathway of the recipient insect cells.

Materials and methods

Cells and cell cultures

Sf9 cells were cultured in TC 100 medium (Gibco-BRL Life Sciences, Grand Island, NY, USA) supplemented with 5% fetal calf serum. The pH was adjusted to 6.2. Cells were cultured as monolayer at 28°C in 25cm² flasks (Falcon, Becton Dickinson).

Cell labeling, sequential extraction, and SDS-PAGE

Labelings were performed when cells had reached confluency. After removal of the culture medium, 2 ml of labeling medium was added (the labeling medium consisted of Grace medium (Gibco-BRL Life Sciences, Grand Island, NY) without glucose, sucrose, and fructose). It has been established that removal of glucose, sucrose, and fructose from Grace medium did not modify the glycosylation pattern of lipid intermediates and

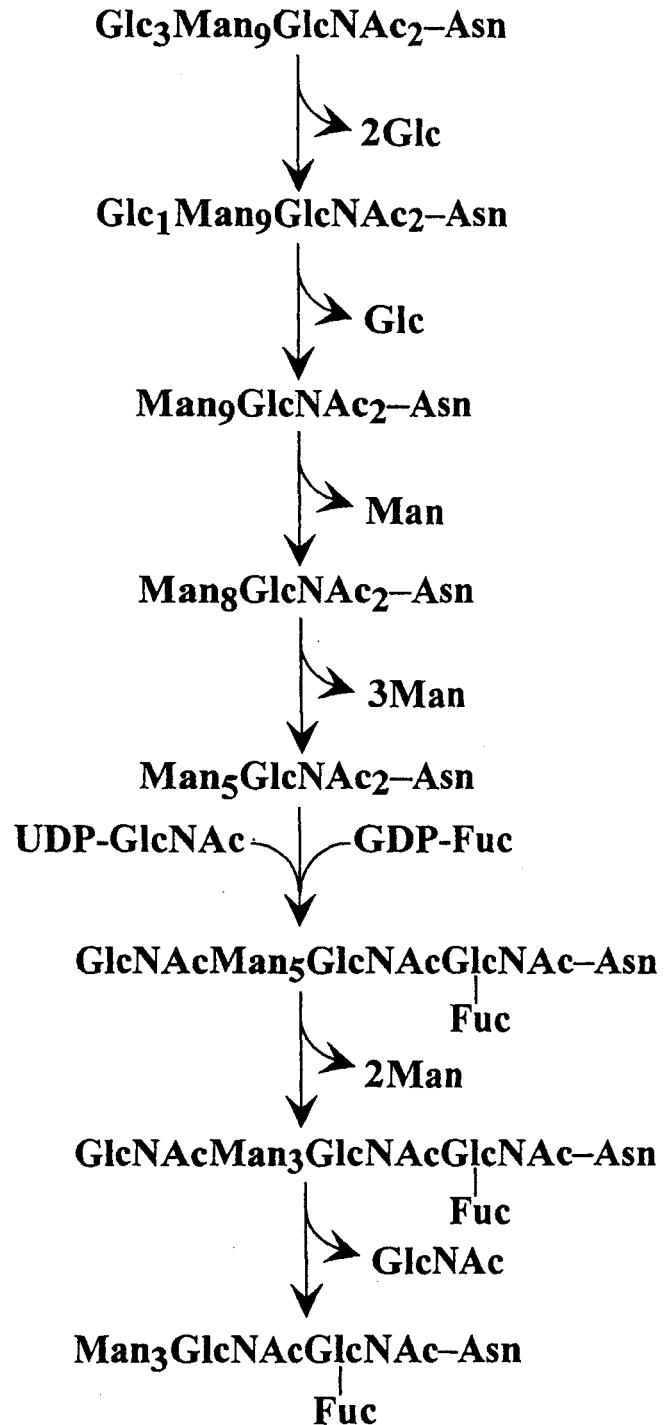


Fig. 8. Proposed pathway for the processing of endogenous glycoproteins of Sf9 cells. The sequence of events leading from $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ bound to asparaginyl residue of glycoproteins to the final $\text{Man}_3(\text{F})\text{GlcNAc}_2$ has been deduced from intermediates characterized after the action of castanospermine, swainsonine, and monensin. Only the intermediates which have been detected in this work have been represented.

glycoproteins but led to an increased incorporation of label. Under standard conditions, incubations were performed at 28°C for 2 h in the presence of 50 $\mu\text{Ci/ml}$ 2-[³H]Man (specific radioactivity: 429GBq/mmol, Amersham, Bucks, UK). When inhibitors were added, the following concentrations were used:

tunicamycin (from 1 to 5 µg/ml), castanospermine (150 µg/ml), swainsonine (5 µM), and monensin (10 µM). A 30 min preincubation was performed in the presence of the inhibitor before adding the radioactive precursor. In the case of fucose labeling, 50 µCi/ml of 6-[³H]Fuc (specific radioactivity: 1.1 TBq/mmol, Amersham, Bucks, UK) were used in the same standard conditions.

After incubation cells were washed with cold PBS pH 6.5, scraped from the flask and resuspended in 350 µl of a mixture containing: sodium cacodylate 0.1 M pH 7.4, immunoglobulin G 0.65%, and 5 mM MgCl₂, then 800 µl of methanol and 1200 µl of chloroform were added. After mixing, a sequential extraction was performed as described by Cacan and Verbert (1995). Briefly, the interphase obtained after centrifugation of the chloroform/methanol/water mixture was extracted with chloroform/methanol/water 10:10:3 (by vol) to obtain the oligosaccharide-PP-Dol fraction and the residual glycoproteins.

For SDS-PAGE electrophoresis, cells were lysed after the incubation period in a Tris/HCl 50 mM buffer pH 7.4 containing 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, and 1% Triton X100. After boiling in reducing sample buffer containing SDS, the samples were run on an SDS-PAGE gel. Hyperfilm from Amersham (Bucks, UK) was used for autoradiography of intensified gels. For quantification of the radioactivity, the proteins were transferred from the gel onto nitrocellulose membranes. The membranes were cut into 2 mm fractions along the electrophoretic path. The radioactivity of each fraction was determined by liquid scintillation counting.

Release of glycan moieties and HPLC analysis

The glycan moieties were released from oligosaccharide-PP-Dol fraction by a mild acid hydrolysis treatment (HCl 0.1M in tetrahydrofuran, 80°C, 2 h).

The glycoprotein pellet was first trypsinized (300 µg TPCK-treated trypsin (Sigma, Saint-Louis, MO) in 300 µl NaHCO₃ 0.1 M pH 7.9) overnight at room temperature. After 10 min boiling, the trypsinate was dried and treated with 500 mU PNGase F (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) in 100 µl phosphate buffer (20 mM pH 7.5, with 50 mM EDTA) overnight at 37°C.

Glycan moieties from oligosaccharide-PP-Dol or glycoprotein hydrolysis were purified on a Biogel P2 column (Bio-Rad, USA) using a 0.1 M acetic acid as solvent.

Radioactive oligosaccharides were recovered and analyzed by HPLC using an amino-derivatized column ASAHIPAK NH₂P-50 (250 × 4.6 mm; Asahi, Kawasaki-ku, Japan). Oligosaccharide species were separated using a gradient of acetonitrile and water from 70/30 by vol to 50/50 by vol at a flow rate of 1 ml/min for 90 min. Peaks are detected using a continuous flow liquid scintillation (Flo-one β detector, Packard, France). Identification of peaks was made by comparing their retention time with standard oligomannosides prepared from lipid intermediates obtained from labeled wild type CHO cells or the Man-P-Dol deficient CHO cells B3F7 (Kmićek *et al.*, 1995). The separation was achieved according to the number of Glc, Man, and GlcNAc residues from Man₁GlcNAc₂ to Glc₃Man₉GlcNAc₂. In the case of separation of fucosylated from nonfucosylated species (Man₃(Fuc)GlcNAc₂ from Man₃GlcNAc₂) and of free mannose from fucose, isocratic conditions (acetonitrile/water, 70/30 by vol) and two successive columns were used.

When preparative chromatography was performed, 1 ml fractions were collected from the column and 50 µl aliquots were counted by liquid scintillation.

Cleavage of fucose by acid hydrolysis

Fucose was released from fucosylated oligosaccharides by mild acid treatment (trifluoroacetic acid 0.05 M at 100°C during 3 h) according to Michalski (1995). After drying under nitrogen, defucosylated samples were analyzed by HPLC.

Exoglycosidase digestions

Oligosaccharide samples (from 50,000 to 200,000 d.p.m.) were incubated with one of the following mixtures at 37°C for 24 h. (1) N-Acetyl-β-hexosaminidase digestion: enzyme from jack bean (200 mU, Oxford Glycosciences, UK) in 100 mM sodium citrate phosphate pH 5 (15 µl total volume). (2) α-Mannosidase digestion: enzyme from jack bean (500 mU, Oxford Glycosciences, UK) in 50 mM sodium acetate pH 5, 1 mM ZnCl₂ (20 µl total volume). (3) α-Fucosidase digestion: enzyme from bovine epididymis (40 mU, Oxford Glycosciences, UK) in 100 mM sodium citrate phosphate pH 6 (15 µl total volume), or enzyme from almond meal (20 µU, Oxford Glycosciences, UK) in 50 mM sodium acetate pH 5 (15 µl total volume). After incubation, enzyme was precipitated by cold ethanol and removed by filtration through 0.45 µm Millipore filter, and then the samples were analyzed by HPLC.

Labeling of proteins

After being preincubated during 30 min with Met/Cys free medium, cell cultures were incubated with 100 µCi of radioactive [³⁵S]Met-[³⁵S]Cys mixture: (Amersham, Bucks, UK). After 30 or 60 min of incubation, the cells were lysed by 1% SDS and precipitated by a mixture of 0.6% PTA and 12% TCA. After filtration on glass fiber filters (Whatman GF/A) and washings by 10% TCA, the precipitates were counted by liquid scintillation.

Acknowledgments

We are very thankful to Drs. Martine Cérutti and Gérard Devauchelle (Station de Pathologie Comparée, INRA CNRS URA 2209, 30380 Saint Christol Lèz Alès, France) for their generous gift of the Sf9 cell line. We are thankful to the Professor Donald Jarvis for his critical reading of the manuscript. This work was supported in part by EEC contract number ERB FMRX CT96 0025 (Caret 2), by CNRS (Programme Physique Chimie du Vivant, Réseau GT-rec) and by USTL.

Abbreviations

ER, endoplasmic reticulum; GnTI, N-acetylglucosaminyltransferase I; GnTII, N-acetylglucosaminyltransferase II; HPLC, high performance liquid chromatography; oligosaccharide-PP-Dol, oligosaccharide pyrophosphodolichol; PBS, phosphate-buffered saline; PNGase, peptide N-glycanase; TPCK, N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone.

References

- Altmann, F. and März, L. (1995) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells: evidence for α-mannosidase II. *Glycoconj. J.*, **12**, 150–155.
- Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glössl, J. and März, L. (1995) Insect cells contain an unusual, membrane-bound β-N-Acetylglucosaminidase probably involved in the processing of proteins N-glycans. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17344–17349.
- Butters, T.D., Hughes, R.C. and Vischer, P. (1981) Steps in the biosynthesis of mosquito cell membrane glycoproteins and the effects of tunicamycin. *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 672–686.

- Cacan, R. and Verbert, A. (1995) Glycosyltransferases of the phosphodolichol pathways. In Verbert, A. (ed.), *Methods on Glycoconjugates: A Laboratory Manual*. Harwood Academy, Chur, Switzerland. pp. 191–199.
- Cecchelli, R., Cacan, R., Porchet-Hennere, E. and Verbert, A. (1986) Dilatation of Golgi vesicles by monensin leads to enhanced accumulation of sugar nucleotides. *Biosci. Rep.*, **6**, 227–234.
- Davidson, D.J., Bretthauer, R.K. and Castellino, F.J. (1991) α -mannosidase-catalyzed trimming of high-mannose glycans in noninfected and baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-SF-21AE). *Biochemistry*, **30**, 9811–9815.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991a) Asparagine-linked oligosaccharide processing in lepidopteran insect cells. Temporal dependence of the nature of the oligosaccharides assembled on asparagine-289 of human plasminogen produced in baculovirus vector infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE) cells. *Biochemistry*, **30**, 6167–6174.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991b) Structures of the asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a *Mamestra brassicae* cell line. *Biochemistry*, **30**, 6689–6696.
- 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.
- Ginsburg, V. (1961) Studies on the biosynthesis of guanosine diphosphate 1-fucose. *J. Biol. Chem.*, **236**, 2389–2393.
- Gunne, H. and Steiner, H. (1993) Efficient secretion of attacin from fat-body cells requires proper processing of the prosequence. *Eur. J. Biochem.*, **214**, 287–293.
- Hsu, T.-A., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Kato, K., Shimada, I., Masuda, K., Whiteley, E.M., Fan, J.-Q., Lee, Y.C. and Betenbaugh, M.J. (1997) Differential N-glycan patterns of secreted and intracellular IgG produced in *Trichoplusia ni* cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9062–9070.
- Jarvis, D.L., Bohlmeier, D.A., Liao, Y.-F., Lomax, K.K., Merkle, R.C., Weinkauff, C. and Moremen, K.W. (1997) Isolation and characterization of a class II α -mannosidase cDNA from lepidopteran insect cells. *Glycobiology*, **7**, 113–127.
- Jarvis, D.L. and Garcia, A., Jr. (1994) Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein. *Virology*, **205**, 300–313.
- 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. Biol.*, **42**, 181–191.
- 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.
- Kawar, Z., Herscovics, A. and Jarvis, D.L. (1997) Isolation and characterization of an α 1,2-mannosidase cDNA from the lepidopteran insect cell line Sf9. *Glycobiology*, **7**, 433–443.
- Kerscher, S., Albert, S., Wucherpfennig, D., Heisenberg, M. and Schneuwly, S. (1995) Molecular and genetic analysis of the *Drosophila mas-1* (mannosidase-I) gene which encodes a glycoprotein processing α 1,2-mannosidase. *Dev. Biol.*, **168**, 613–626.
- Kmićek, D., Herman, V., Stroop, C.J.M., Michalski, J.-C., Mir, A.-M., Labiau, O., Verbert, A. and Cacan, R. (1995) Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single Man₅GlcNAc oligosaccharide isomer: a study with permeabilized CHO cells. *Glycobiology*, **5**, 483–494.
- Kobata, A. (1979) Use of endo- and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates. *Anal. Biochem.*, **100**, 1–14.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 631–664.
- Liang, C.-J., Yamashita, K., Muellenberg, C.G., Shichi, H. and Kobata, A. (1979) Structure of the carbohydrate moieties of bovine rhodopsin. *J. Biol. Chem.*, **254**, 6414–6418.
- Michalski, J.-C. (1995) Analysis of monosaccharides by GLC and HPLC. In Verbert, A. (ed.), *Methods on Glycoconjugates: A Laboratory Manual*. Harwood Academy, Chur, Switzerland, pp. 31–38.
- Ogonah, O.W., 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. *BioTechnology*, **14**, 197–202.
- Pan, Y.T., Hori, H., Saul, R., Sanford, B.A., Molyneux, R.J. and Elbein, A.D. (1983) Castanospermine inhibits the processing of the oligosaccharide portion of the Influenza viral hemagglutinin. *Biochemistry*, **22**, 3975–3984.
- Parker, G.F., Williams, P.J., Butters, T.D. and Roberts, D.B. (1991) Detection of the lipid-linked precursor oligosaccharide of N-linked protein glycosylation in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.*, **290**, 58–60.
- Quesada Allue, L.A. and Belocopitow, E. (1978) Lipid-bound oligosaccharides in insects. *Eur. J. Biochem.*, **88**, 529–541.
- Ren, J., Bretthauer, R.K. and Castellino, F.J. (1995) Purification and properties of a Golgi-derived (α 1,2)-mannosidase-I from baculovirus-infected lepidopteran insect cells (IPLB-SF21AE) with preferential activity toward mannosyl-N-acetylglucosamine₂. *Biochemistry*, **34**, 2489–2495.
- Ren, J., Castellino, F.J. and Bretthauer, R.K. (1997) Purification and properties of α -mannosidase II from Golgi-like membranes of baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE) cells. *Biochem. J.*, **324**, 951–956.
- Sagami, H. and Lennarz, W.J. (1987) Glycoprotein synthesis in *Drosophila Kc* cells. *J. Biol. Chem.*, **262**, 15610–15617.
- Staudacher, E., Kubelka, V. and März, L. (1992) Distinct N-glycan fucosylation potentials of three lepidopteran cell lines. *Eur. J. Biochem.*, **207**, 987–993.
- Tartakoff, A.M., Vassalli, P. and Detraz, M. (1978) Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. *J. Cell. Biol.*, **79**, 694–707.
- Tulsiani, D.R.P., Harris, T.M. and Touster, O. (1982) Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II. *J. Biol. Chem.*, **247**, 7936–7939.
- Velardo, M.A., Bretthauer, R.K., Boutaud, A., Reinhold, B., Reinhold, V.D. and Castellino, F.J. (1993) The presence of UDP-N-acetylglucosamine: α -3-D-mannoside β -1,2-N-acetylglucosaminyl transferase I activity in *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-SF-21AE) and its enhancement as a result of baculovirus infection. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17902–17907.
- Wilson, J.R., Williams, D. and Schachter, H. (1976) The control of glycoprotein synthesis: N-acetylglucosamine linkage to a mannose residue as a signal for the attachment of 1-fucose to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue of glycopeptide from α 1-acid glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 909–916.
- Yurchenko, P.D. and Atkinson, P.H. (1977) Equilibration of fucosyl glycoprotein pools in HeLa cells. *Biochemistry*, **16**, 944–953.

3. Discussion

La maturation des *N*-glycannes est un processus rigoureusement ordonné et compartimenté. Il fait intervenir des enzymes de spécificité très stricte qui doivent trouver dans le même compartiment subcellulaire tous leurs substrats. Ainsi, la présence dans un extrait cellulaire d'une activité enzymatique donnée n'implique pas qu'elle soit effective *in vivo*. L'objectif poursuivi dans ce travail était d'étudier les intermédiaires réellement produits dans les cellules Sf9, grâce à des marquages métaboliques des *N*-glycannes.

En utilisant des inhibiteurs de la glycosylation ou du trafic intracellulaire, nous avons mis en évidence des intermédiaires clés de ce processus. La castanospermine, en inhibant les glucosidases du reticulum endoplasmique, provoque l'accumulation d'espèces glucosylées. La swainsonine, inhibiteur de la mannosidase II, révèle l'intermédiaire GlcNAcMan₅GlcNAc₂. Une partie au moins de cette espèce est fucosylée sur le résidu d'attache à la protéine. Cette observation montre qu'une α 1,6-fucosyltransférase est capable d'agir dès ce stade.

Nous avons en outre observé qu'en plus des résidus de mannose, les résidus de fucose étaient radioactifs après un marquage métabolique au 2-[³H]Man. La principale source de fucose sur les glycoconjugués est en effet la conversion du GDP-Man en GDP-Fuc (Tonetti *et al.*, 1998). Le fucose exogène n'est que très peu incorporé, comme nous l'ont montré des expériences de marquage avec du fucose radioactif. Dans le cas de 2-[³H]Man, seule la conversion en GDP-Fuc conserve la radioactivité, de sorte que les seuls résidus marqués sont le mannose et le fucose.

Enfin, la monensine nous a permis d'observer, en dépit d'une très forte diminution de l'incorporation du mannose précurseur, un nouvel intermédiaire de structure GlcNAcMan₃FucGlcNAc₂. Cet intermédiaire est, selon toute vraisemblance, utilisé par la β -*N*-acétylglucosaminidase pour produire la structure finale Man₃FucGlcNAc₂. En outre, nous avons constaté qu'en présence de monensine, seuls les résidus de fucose sont radioactifs : ainsi, l'incorporation dans ces conditions est liée exclusivement à la fucosylation de glycoprotéines synthétisées avant l'addition de la monensine et bloquées dans l'appareil de Golgi. La figure 19 présente notre interprétation des effets de la monensine.

L'observation de l'espèce GlcNAcMan₃FucGlcNAc₂ en présence de monensine, alors qu'elle est indétectable en situation contrôle, suggère fortement un blocage dans un compartiment

ne contenant pas la glucosaminidase. Cette enzyme apparaît donc physiquement séparée des enzymes catalysant les étapes précédentes (mannosidase II et α 1,6-fucosyltransférase). Il est par conséquent probable que cette enzyme soit située dans un compartiment tardif de la voie de sécrétion.

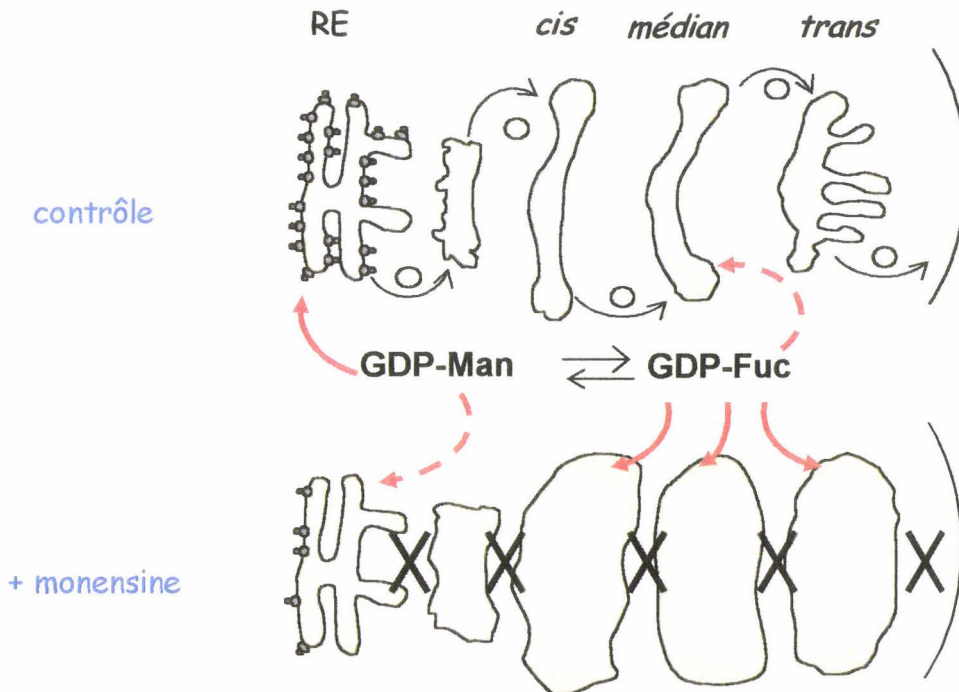


Figure 19 : Effets de la monensine

En situation contrôle, le mannose est en majorité incorporé dans le RE pour la biosynthèse de glycoprotéines. Seule une partie est incorporée sous forme de fucose dans l'appareil de Golgi. En présence de monensine, la synthèse protéique est abolie, le mannose n'est donc plus incorporé dans le RE. Les saccules golgiens sont dilatés et incorporent plus de nucléotides-sucres. Le seul marquage radioactif observé est donc dû à la fucosylation de glycoprotéines synthétisées avant le marquage et l'addition de monensine et bloquées dans l'appareil de Golgi.

Ce travail nous a permis d'établir que la voie de maturation des *N*-glycannes dans les cellules d'insectes est parallèle à celle des cellules de mammifères jusqu'à un intermédiaire de structure $\text{GlcNAcMan}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$ et confirme donc ce qu'indiquaient les données structurales et enzymatiques. Les divergences sont liées à l'existence, dans les cellules d'insectes, d'une β -*N*-acétylglucosaminidase qui convertit le $\text{GlcNAcMan}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$ en $\text{Man}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$. La figure 20 résume le chemin métabolique suivi dans chacun des deux cas.

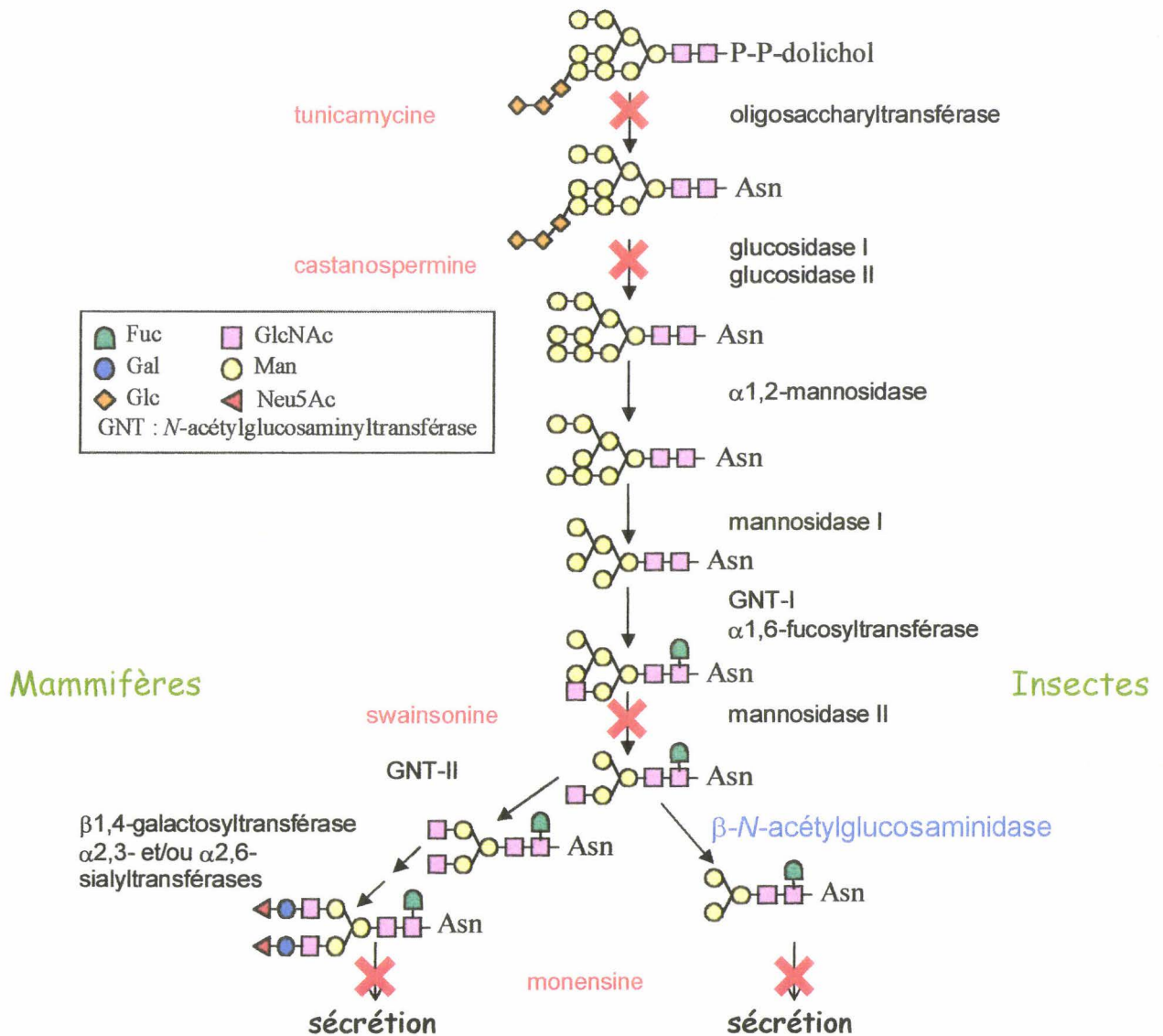


Figure 20 : Voies de maturation des *N*-glycannes dans les cellules de mammifères et d'insectes

D'après ces résultats, l'inactivation de la β -*N*-acétylglycosaminidase peut s'avérer utile dans une stratégie d'"humanisation" des cellules d'insectes. Néanmoins, le gène codant cette nouvelle enzyme n'a pas été identifié à ce jour et le clonage est compliqué par l'existence, chez les insectes, de chitinases. En outre, il faut signaler qu'une mannosidase III a récemment été identifiée dans des cellules Sf9 (Kawar *et al.*, 2001). Cette enzyme est golgienne, sensible à la

swainsonine mais se distingue de la mannosidase II par sa propriété d'agir sur le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, mais pas sur le $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$, pour produire le $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Son implication effective dans la biosynthèse des *N*-glycannes tronqués reste à étudier.

Une autre façon de modifier le métabolisme est d'augmenter l'expression de certaines glycosyltransférases pour orienter le flux métabolique vers la formation de *N*-glycannes de type complexe. C'est ce que nous allons illustrer par une étude sur l'expression d'une β 1,4-galactosyltransférase dans les cellules Sf9, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de D.L. Jarvis (Université du Wyoming).

II. Exemple d'ingénierie de la glycosylation dans les cellules d'insectes : expression d'une galactosyltransférase

1. Introduction

Les tentatives de modification de la glycosylation dans les cellules d'insectes ont, comme discuté dans l'introduction, impliqué la surexpression de glycosyltransférases déjà présentes ou l'addition de nouvelles enzymes.

Ainsi, l'une des premières expériences a été d'exprimer de façon stable une β 1,4-galactosyltransférase (Hollister *et al.*, 1998). Les cellules Sf β 4GalT ainsi produites contiennent l'ADNc de la β 1,4-galactosyltransférase bovine sous le contrôle du promoteur précoce viral *ie1*. Ce promoteur, actif dès le début de l'infection, utilise des facteurs de transcription cellulaires (Jarvis *et al.*, 1996). Dans leur étude, les auteurs montrent que la gp64 produite lors de l'infection de ces cellules par un baculovirus sauvage est réactive à la lectine RCA, et qu'elle contient donc des résidus de galactose terminaux.

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire où ces cellules ont été produites, nous avons examiné la nature des *N*-glycannes produits en présence de cette galactosyltransférase.

2. Résultats

2.1. Structures *N*-glycanniques synthétisées par les cellules Sf β 4GalT

Après un marquage métabolique de 2 heures avec du mannose tritié, suivi d'une extraction séquentielle des intermédiaires du cycle des dolichols (voir l'article précédent et Cacan et Verbert, 1995), les oligosaccharides liés aux protéines dans les cellules Sf9 ou dans les cellules Sf β 4GalT ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les profils obtenus sont représentés sur la figure 21. Le pic supplémentaire (A) détecté dans le cas des cellules Sf β 4GalT a le même temps de rétention qu'un standard Man₅GlcNAc₂. Ce pic a été isolé, et sa structure examinée au moyen de digestions par des exoglycosidases (figure 22). Après action de la β -galactosidase, le pic A migre avec le même temps de rétention qu'un standard Man₄GlcNAc₂. L'action séquentielle de la β -galactosidase et de l'hexosaminidase produit le Man₃[Fuc]GlcNAc₂. Le pic A représente donc une espèce GalGlcNAcMan₃[Fuc]GlcNAc₂. Etant

donné l'absence d'activité *N*-acétylglucosaminyl-transférase II dans ces cellules, la branche galactosylée est, selon toute vraisemblance, portée par le mannose en α 1,3.

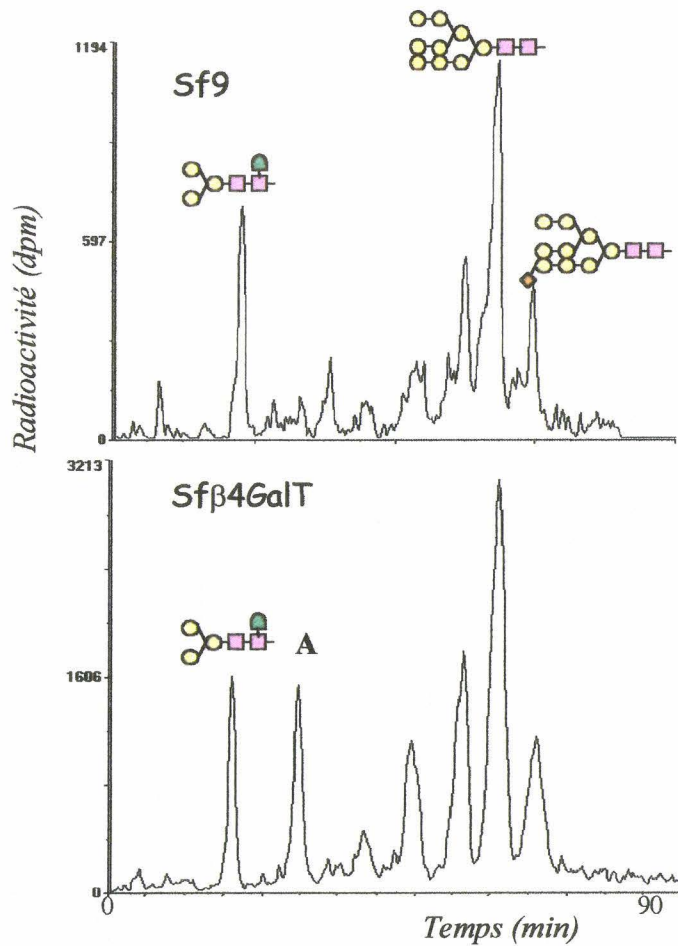


Figure 21 : Analyse par HPLC des *N*-glycannes marqués dans les cellules *Sf9* ou *Sfβ4GalT*

Les cellules *Sf9* ou *Sfβ4GalT* ont été incubées pendant 2h avec du 2- ^{3}H Man conformément à l'article I. Après une extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques, les oligosaccharides liés aux protéines ont été libérés par la PNGase, dessalés puis analysés par HPLC.

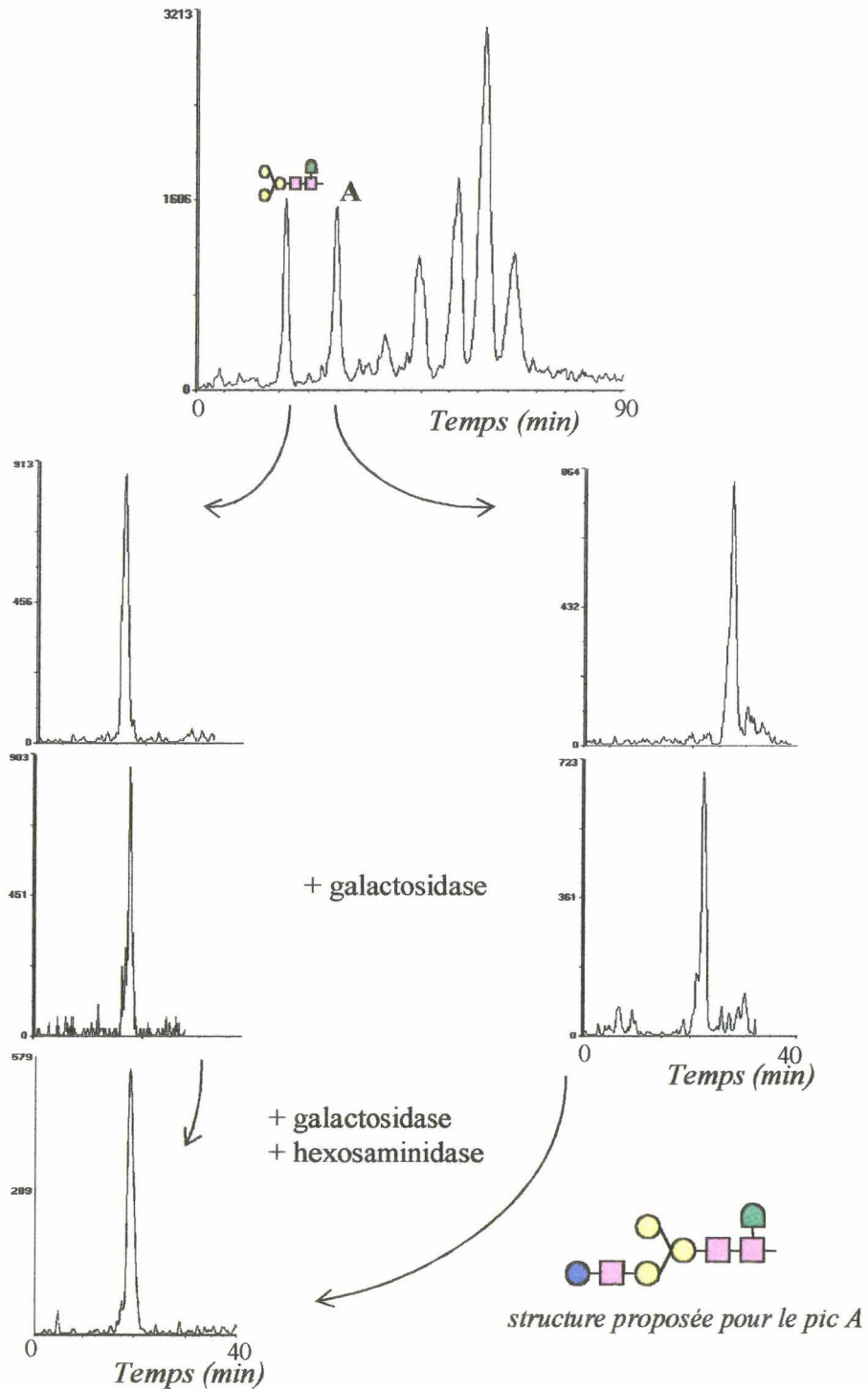


Figure 22 : Détermination de la structure représentée par le pic A

Après un marquage des cellules Sf β 4GalT au 2-[3 H]Man, les différentes espèces oligosaccharidiques libérées des protéines ont été isolées par HPLC préparative. Le pic de Man3[Fuc]GlcNAc2 et le pic A ont été traités par la β -galactosidase de jack bean ou par la β -galactosidase puis la β -hexosaminidase de jack bean avant d'être analysés par HPLC.

2.2. Etude de la galactosylation de surface

Les résultats de Hollister *et al.* ainsi que les marquages précédents montrent que les cellules Sf β 4GalT produisent des *N*-glycannes galactosylés. Néanmoins, les travaux de Licari *et al.* (1993) indiquent que diverses lignées cellulaires de Lépidoptères, dont la lignée Sf9, produisent et sécrètent des exoglycosidases, notamment des activités β -galactosidase et hexosaminidase. Ces enzymes pourraient intervenir pour digérer les espèces galactosylées produites par les cellules Sf β 4GalT. Afin de déterminer si les espèces finales synthétisées par les cellules Sf β 4GalT non infectées étaient effectivement galactosylées, il nous a paru intéressant d'examiner la galactosylation en surface de ces cellules. Dans ce but, les cellules Sf β 4GalT ainsi que des cellules Sf9 ont été incubées avec une lectine spécifique des résidus de β -galactose et couplée à un fluorophore. La fixation de la lectine RCA₁₂₀ (*Ricinus communis* agglutinin) sur les cellules a été observée par cytofluorimétrie en flux, dont les résultats sont présentés sur la figure 23. La même expérience a également été faite sur les cellules Ea4. Ce clone cellulaire a été isolé par Ogonah *et al.* (1996) à partir d'une lignée parentale issue d'*Estigmene acraea* et sélectionné pour sa capacité à produire des *N*-glycannes de type complexe liés à l'interféron γ humain recombinant. Dans ce cas précis, les *N*-glycannes produits sont galactosylés mais non sialylés et on observe jusqu'à trois antennes. Depuis ce résultat, les cellules Ea4 sont commercialisées par la firme Novagen sur la base de leurs meilleures capacités de production et de glycosylation des protéines recombinantes.

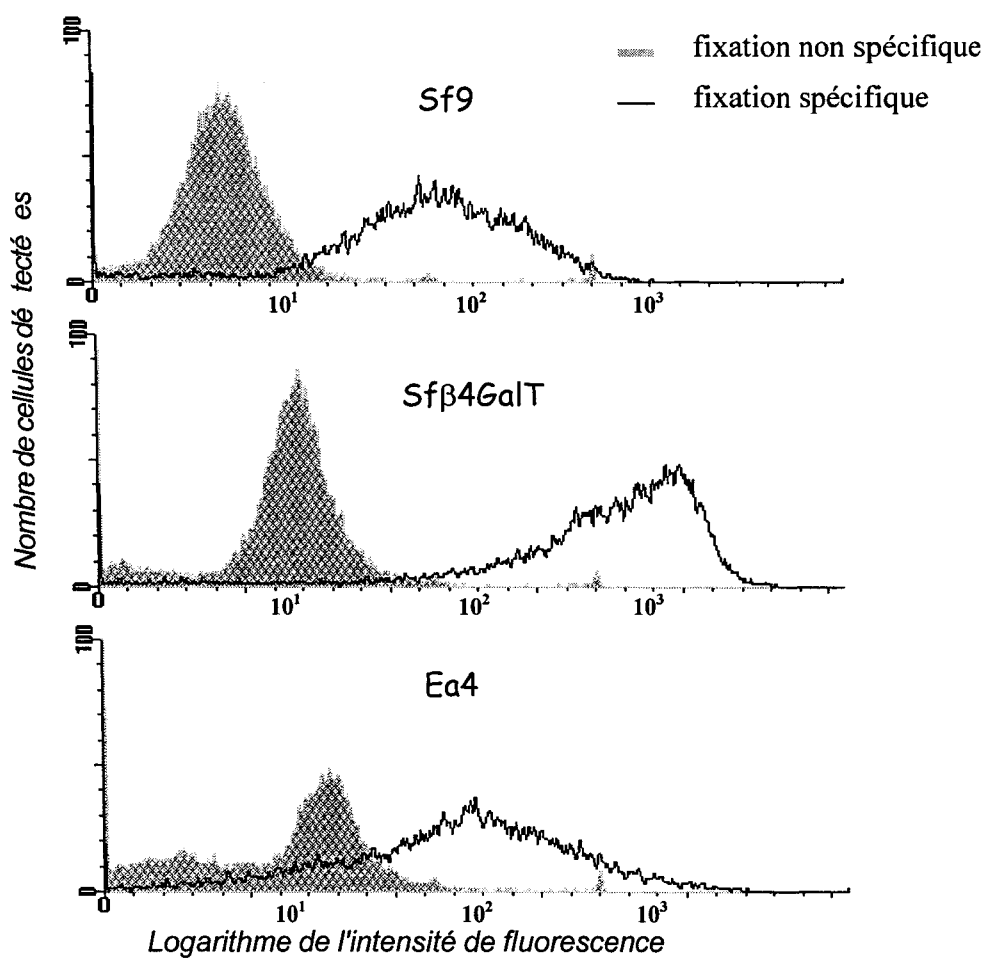


Figure 23 : Analyse de la galactosylation de surface par cytofluorimétrie de flux

Les cellules ($0,5$ à 1×10^6 cellules par expérience) ont été incubées en présence de RCA₁₂₀ à $1 \mu\text{g/mL}$ et de 5mg/mL de BSA. La fixation non spécifique a été mesurée en présence de 100mM de lactose.

Une fixation spécifique de la lectine RCA est observée pour les trois lignées, mais elle est nettement plus importante dans le cas des cellules Sfβ4GalT que pour les deux autres, ce qui

révèle une galactosylation de surface plus importante. Aucune différence significative n'est observée entre les lignées Sf9 et Ea4.

Ce résultat montre que les résidus de Gal fixés sur les glycoprotéines membranaires ne sont pas éliminés par d'éventuelles β -galactosidases.

2.3. Effet de l'infection par un baculovirus

Nous avons ensuite examiné les structures *N*-glycanniques produites dans les cellules Sf9 et Sf β 4GalT lors d'une infection par un baculovirus. Jarvis (1993) a en effet constaté que dans des cellules transfectées contenant un gène étranger contrôlé par le promoteur *ie1*, l'infection par un baculovirus provoque une activation transitoire du transgène en début d'infection. De la même façon, Hollister et Jarvis (2001) observent une importante augmentation de l'activité β 1,4-galactosyltransférase dans les cellules Sf β 4GalT dès le début de l'infection. Afin de rechercher si cette activation de la galactosyltransférase a une influence sur les structures *N*-glycanniques, les cellules Sf β 4GalT ont été infectées par le baculovirus AcSLP10 puis marquées avec du mannose radioactif 48h après l'infection. Les profils glycanniques obtenus sont reportés sur la figure 24.

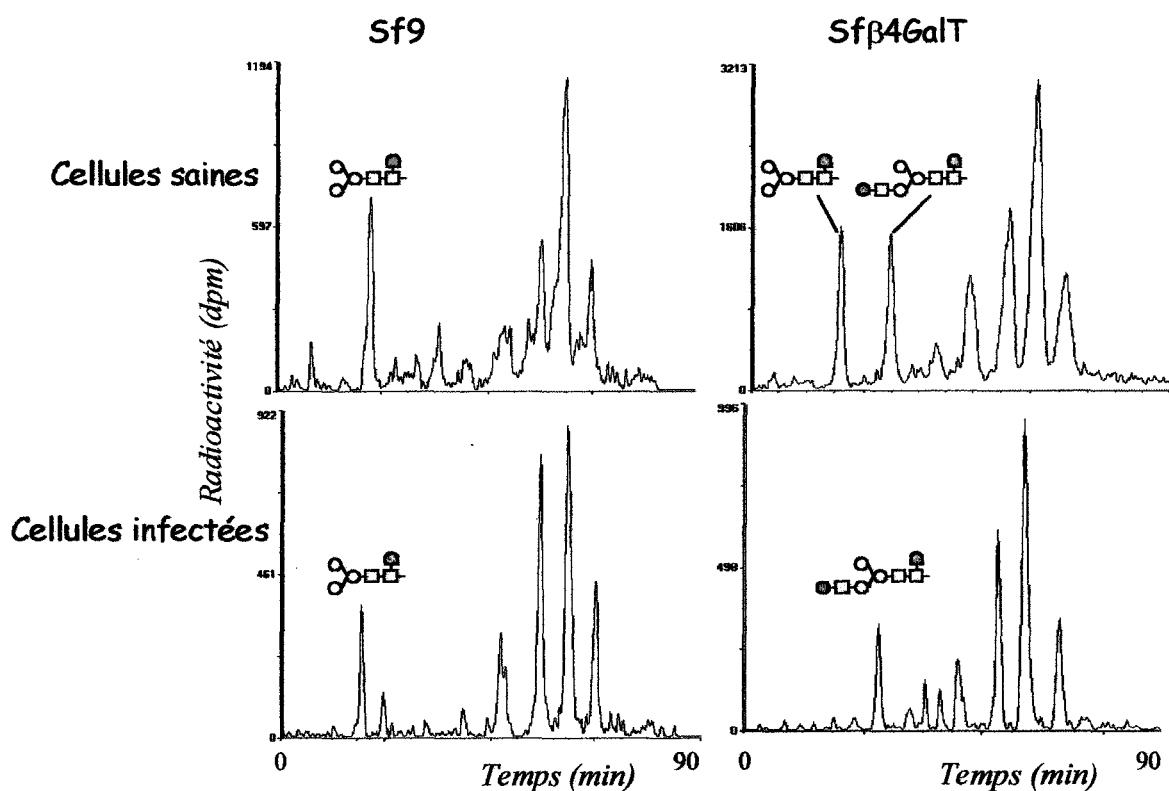


Figure 24 : Profils HPLC des N-glycannes synthétisés par les cellules Sf9 ou Sf β 4GalT saines ou infectées par un baculovirus

Les cellules ont été infectées avec le virus AcSLP10 (voir l'appendice technique et l'article suivant) à une multiplicité d'infection de 5 pfu/cellule. Le marquage métabolique au 2- 3 H]Man a été effectué à 48h p.i. ou sur des cellules non infectées.

Après 48h d'infection, les espèces finales détectées lors d'un marquage de 2h sont moins importantes que pour des cellules saines, ce qui traduit une maturation légèrement ralentie. Ce ralentissement est normal puisque l'infection virale inhibe la transcription des gènes cellulaires. Néanmoins, le profil observé avec les cellules Sf9 infectées reste qualitativement semblable à celui obtenu hors infection. Dans le cas des cellules Sf β 4GalT, au contraire, l'espèce Man3[Fuc]GlcNAc2 n'est plus détectée, seule l'espèce galactosylée est observée. Le flux métabolique a été totalement dévié vers la production d'un glycanne galactosylé au détriment de la forme paucimannose.

3. Discussion

Comme discuté précédemment, l'absence de *N*-glycannes de type complexe au profit de *N*-glycannes paucimannosidiques chez les insectes est essentiellement due à deux phénomènes : (i) l'existence d'une activité β -*N*-acétylglucosaminidase et (ii) l'absence de glycosyltransférases terminales. L'inactivation de la glucosaminidase ne suffirait donc pas à la synthèse de glycannes complets. En revanche, l'addition des transférases terminales absentes s'avérerait inutile si la glucosaminidase pouvait agir avant. Une enzyme clé pour la modification des potentialités de glycosylation dans ces cellules est donc la β 1,4-galactosyltransférase, susceptible d'entrer en compétition avec la glucosaminidase pour le même substrat $\text{GlcNAcMan}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$. Les résultats que nous avons obtenus précédemment en présence de monensine suggèrent toutefois que la glucosaminidase est localisée dans un des compartiments les plus tardifs de la voie de sécrétion.

Les travaux entamés par Jarvis et Finn (1996) et poursuivis par Hollister *et al.* (1998) ont impliqué l'expression d'un ADNc codant une β 1,4-galactosyltransférase bovine. Les glycoprotéines produites dans ce cas étaient effectivement reconnues par une lectine spécifique du galactose, indiquant que l'enzyme avait pu galactosyler une partie au moins des *N*-glycannes avant l'action de la glucosaminidase.

Les marquages métaboliques que nous avons réalisés sur les cellules Sf β 4GalT montrent que la moitié environ des *N*-glycannes néosynthétisés sont en effet galactosylés. La voie de maturation est donc partiellement déviée vers la formation de *N*-glycannes de type complexe. De façon intéressante, l'activation de la production de la galactosyltransférase lors de l'infection suffit à dévier la totalité des *N*-glycannes vers le type complexe, puisque seule la structure galactosylée est observée. Néanmoins, une seule branche est occupée, ce qui confirme l'absence d'activité *N*-acétylglucosaminyltransférase II. En outre, les nouvelles structures ne sont pas sialylées. L'absence d'acides sialiques dans les cellules d'insectes sauvages n'est donc pas due seulement à un défaut d'accepteur, mais aussi à un défaut de transférase et/ou de donneur CMP-Neu5Ac.

La production de glycoprotéines galactosylées a également été analysée par cytofluorimétrie de flux en utilisant une lectine fluorescente spécifique des résidus de galactose. La galactosylation de surface des cellules Sf β 4GalT s'est révélée nettement supérieure à celle des

cellules Sf9 et Ea4. Dans le cas des cellules Sf9, la lectine révèle probablement des *O*-glycannes et des glycolipides galactosylés. La faible galactosylation des cellules Ea4 est plus surprenante, puisque Ogonah *et al.* (1996) rapportent la présence de galactose terminal sur les *N*-glycannes liés à l'interféron γ recombinant dans ces cellules.

Ces résultats montrent qu'il est donc envisageable de modifier les capacités de glycosylation du système baculovirus-cellules d'insectes simplement en ajoutant les glycosyltransférases absentes (figure 25). L'inactivation de la glucosaminidase ne semble pas indispensable mais peut être envisagée pour optimiser la synthèse de *N*-glycannes complexes.

Cette stratégie n'est toutefois possible que lorsque les donneurs sont déjà présents dans les cellules. Le problème de la sialylation est plus compliqué puisque plusieurs études, dont celle de Hooker *et al.* (1999) ont démontré l'absence de CMP-Neu5Ac dans les cellules d'insectes. Les auteurs prévoient donc que l'addition de sialyltransférases ne peut suffire à l'obtention de glycoprotéines sialylées, mais qu'il est nécessaire d'ajouter également tous les gènes assurant la synthèse et le transport de CMP-Neu5Ac absents des cellules d'insectes.

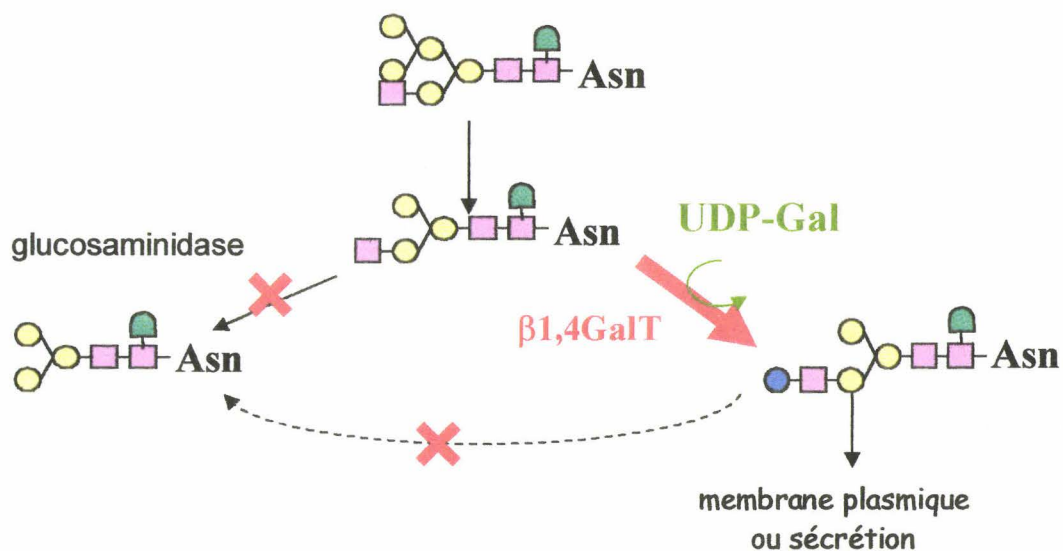


Figure 25 : Schéma de la voie de maturation des *N*-glycannes dans les cellules d'insectes exprimant la β 1,4-galactosyltransférase

La galactosylation de l'intermédiaire $\text{GlcNAc}[\text{Fuc}]\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ empêche l'action de la β -*N*-acétylglucosaminidase. β 1,4GalT : β 1,4-galactosyltransférase.

III. Une autre voie possible pour sialyler des glycoprotéines dans le système baculovirus-cellules d'insectes : expression d'une *trans*-sialidase

1. Introduction

Le parasite *Trypanosoma cruzi* est incapable de synthétiser des acides sialiques. Pourtant, la forme humaine porte des antigènes de surface sialylés, contenant notamment du Neu5Ac et du Neu5Gc (Schauer *et al.*, 1983) qui paraissent nécessaires à son infectivité (Schenkman *et al.*, 1991). La sialylation est en effet réalisée grâce à une *trans*-sialidase située à la surface du parasite et capable d'utiliser des glycoconjugués de l'hôte.

Comme nous en avons discuté précédemment et dans la revue générale en annexe, les cellules d'insectes en culture ne produisent pas de glycoprotéines sialylées, et ceci pour plusieurs raisons : (i) un manque d'accepteurs galactosylés, (ii) un manque d'activité sialyltransférase et (iii) un manque de donneur d'acides sialiques. Le premier point est partiellement résolu par les travaux de Hollister *et al.* (1998) qui montrent que l'expression de la β 1,4-galactosyltransférase permet la synthèse d'accepteurs galactosylés. Concernant les deux autres, une possibilité pour obtenir des glycoprotéines sialylées est d'ajouter tous les gènes nécessaires à la synthèse, au transport et au transfert de CMP-Neu5Ac. Nous avons opté pour une autre stratégie mimant celle du trypanosome.

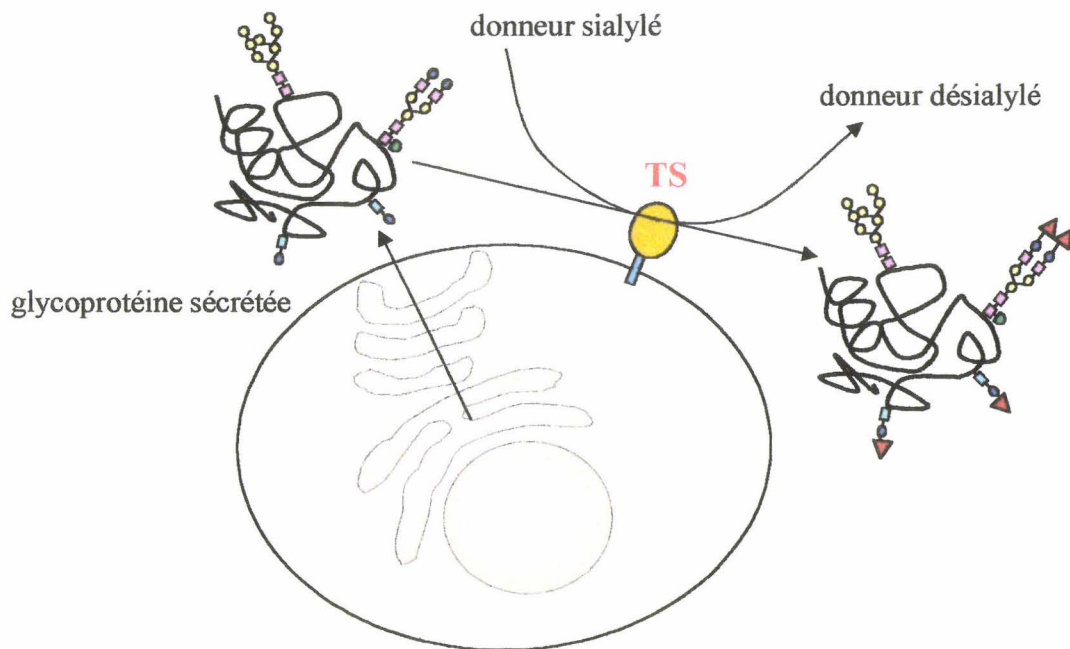


Figure 26 : Stratégie d'ingénierie de la sialylation dans le système baculovirus-cellules d'insectes utilisant une trans-sialidase

Dans cette stratégie, illustrée par la figure 26, la *trans*-sialidase exprimée en surface doit pouvoir utiliser des donneurs présents dans le milieu de culture pour sialyler les glycoprotéines sécrétées, pourvu qu'elles portent des résidus de β -galactose terminaux.

Dans cette optique, nous avons réalisé une construction moléculaire constituée du domaine catalytique et du domaine Fn3 de la *trans*-sialidase de *T. cruzi* (Campetella *et al.*, 1994) fusionnés au segment transmembranaire de la gp64 (Whitford *et al.*, 1989), glycoprotéine majeure de l'enveloppe du baculovirus. Cette séquence transmembranaire a été choisie pour plusieurs raisons :

- ☆ Chez le parasite, la *trans*-sialidase est liée à la membrane plasmique par un ancrage GPI, or la capacité des cellules Sf9 à réaliser l'ancrage GPI semble limitée, surtout lors de l'infection par un baculovirus ;
- ☆ La *trans*-sialidase est donc liée à la membrane par son côté C-terminal, c'est aussi le cas de la gp64. L'utilisation de cette séquence permet donc de respecter l'orientation de l'enzyme (figure 27) ;

☆ Au cours d'une infection, la gp64 du baculovirus s'intègre dans la membrane plasmique et dans l'enveloppe des particules virales bourgeonnantes.

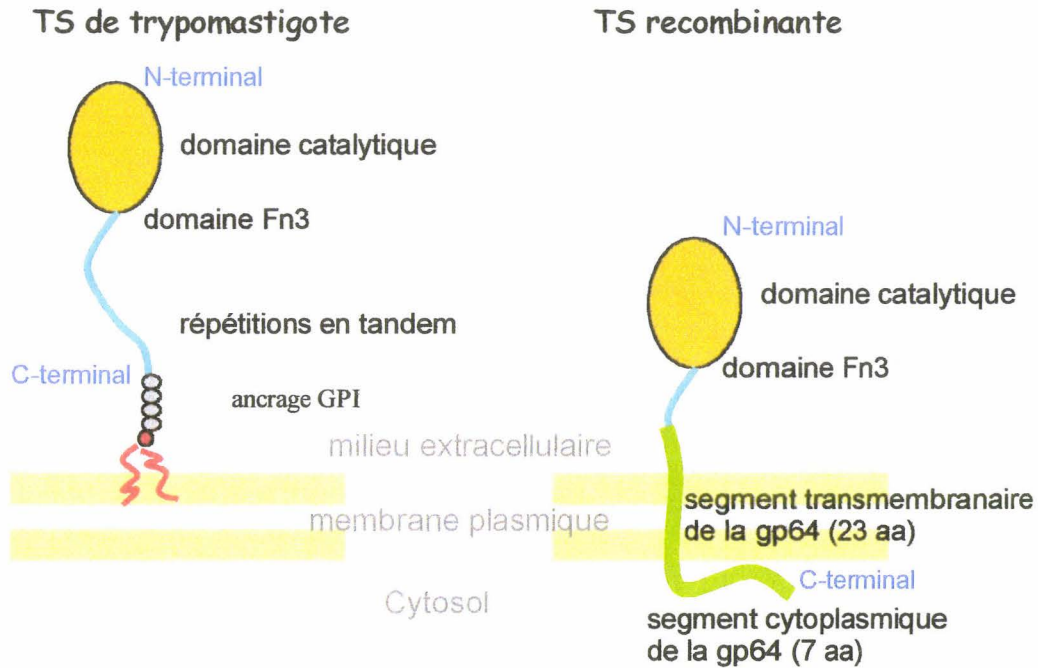


Figure 27 : Comparaison entre la structure de la trans-sialidase native et la structure attendue de la trans-sialidase chimérique

De plus, afin de permettre un adressage efficace vers la voie de sécrétion (Tessier *et al.*, 1991 et Jarvis *et al.*, 1993), un peptide signal du baculovirus a été utilisé. La séquence issue du gène codant l'ecdystéroïde-glucosyltransférase du virus AcMNPV (O'Reilly and Miller, 1989) a été fusionnée du côté N-terminal à la construction.

Dans une première approche, la protéine chimérique a été exprimée dans un vecteur baculovirus, sous le contrôle du promoteur tardif du gène *p10*. Le virus recombinant a été désigné AcP10TS.

2. Résultats

Ces travaux ont été possibles grâce à une collaboration avec le Dr M. Cerutti (UMR n° 5087 INRA / CNRS / Université de Montpellier II, Saint-Christol lez Alès).

2.1. Article II

L'expression et la caractérisation de la *trans*-sialidase, ainsi qu'une illustration de son activité, ont fait l'objet d'un article paru dans *Glycobiology*.

Article II :

Marchal, I., Cerutti, M., Mir, A.-M., Juliant, S., Devauchelle, G., Cacan, R and Verbert, A. (2001)

Expression of a membrane-bound form of *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase in baculovirus-infected insect cells: a potential tool for sialylation of glycoproteins produced in the baculovirus-insect cells system

Glycobiology 11(7), 593-603.

Expression of a membrane-bound form of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in baculovirus-infected insect cells: a potential tool for sialylation of glycoproteins produced in the baculovirus–insect cells system

Ingrid Marchal², Martine Cerutti³, Anne-Marie Mir², Sylvie Juliant³, Gérard Devauchelle³, René Cacan^{1,2}, and André Verbert²

²Laboratoire de glycobiologie structurale et fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche du CNRS no. 8576, Université des Sciences et Technologies de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France, and ³Station de Pathologie Comparée INRA/Unité Mixte de Recherche du CNRS no. 5087/ Université de Montpellier II, 30380 Saint-Christol lez Alès, France.

Received on January 17, 2001; revised on March 20, 2001; accepted on March 21, 2001

A chimeric protein containing the catalytic domain of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, the transmembrane domain of the major envelope glycoprotein of the baculovirus (gp67), and the signal peptide of ecdysteroid glucosyltransferase of the baculovirus was expressed under the control of the very late promoter p10 in baculovirus-infected lepidopteran cells. The recombinant protein was found to be enzymatically active. Three days after infection, equal amounts of activity were found associated to the plasma membrane and in the infection medium, both forms having the same apparent molecular weight and being N-glycosylated. When exogenous galactosylated acceptors (lactose or asialo- α 1-acid glycoprotein) were added in the culture medium of cells infected with the recombinant baculovirus in the presence of a sialylated donor, a sialylation could be observed. Therefore, we propose the use of trans-sialidase as a potential tool for sialylation of glycoconjugates in the baculovirus–insect cells system.

Key words: baculovirus/insect cells/recombinant glycoproteins/sialic acid/trans-sialidase

Introduction

Insect cells, in combination with baculovirus-based expression vectors, are widely used as hosts for the expression of heterologous eukaryotic gene products (reviewed by Miller, 1988; Fraser, 1992; Jarvis, 1997). The relative ease and speed with which a recombinant protein is produced and the high expression levels allowed by the use of strong promoters; in addition, the processing abilities of insect cells, essentially similar to those of vertebrates, have contributed to their development. In terms of safety, the baculovirus expression system is also promising because the cells can be cultured in serum-free and even protein-free media. However, for therapeutic purposes, a

strictly controlled quality of the recombinant proteins is required, and this has stimulated the examination of the post-translational processes that occur in insect cells. Lepidopteran insect cell lines, by far the most widely used, have been shown to perform most of the posttranslational events, including specific proteolytic cleavages, oligomerization of multimeric proteins, phosphorylation, acylation, and glycosylation.

However, it is now well known that N- and O-glycosylation are highly cell type-dependent modifications, and it has been extensively reviewed that insect cells glycosylation substantially differs from the mammalian-type glycosylation (März *et al.*, 1995). As summarized by Altmann *et al.* (1999), this constitutes a serious barrier for therapeutic use of baculovirus-expressed glycoproteins. Typically, the early events in glycosylation pathways are conserved from insects to mammals, and the divergences reside in the terminal reactions. The O-glycans produced by insect cells are generally reduced to a single GalNAc (Tn antigen) or the disaccharide Gal β 1,3GalNAc (T antigen) (Thomsen *et al.*, 1990; Grabenhorst *et al.*, 1993; Sugiyama *et al.*, 1993; Lopez *et al.*, 1999). The N-glycosylation potential has been investigated more, both on endogenous and baculovirus-expressed glycoproteins. Most studies showed that the major structures are truncated N-glycans, highly fucosylated (Grabenhorst *et al.*, 1993; Manneberg *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1997). These short species are explained by a trimming reaction catalyzed by a Golgi-located β -N-acetylglucosaminidase (Altmann *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1996a; Marchal *et al.*, 1999). However, in some cell lines showing low levels of this enzyme, such as Ea4 from *Estigmene acrea* or in High Five cells (TN-5B1-4) derived from *Trichoplusia ni*, the glycosylation capacities can be extended to N-glycans containing low amounts of terminal galactose (Ogonah *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1997; Hooker *et al.*, 1999; Rudd *et al.*, 2000). The presence of sialic acids (reviewed by Marchal *et al.*, 2001) has been reported in some cases; however, it must be recognized that the sialylation in insect cells occurs with extreme low frequency and seems to be restricted to particular glycoproteins (see, for example, Davidson *et al.*, 1990) or to be tissue-specific. Sialic acids were detected during the development of *Drosophila* embryos (Roth *et al.*, 1992) and, more recently, in larval tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) (Karaçali *et al.*, 1997, 1999) and of the cicada *Philaenus spumarius* (Malykh *et al.*, 1999). Thus, it can be speculated that complex N-glycosylation might be essential at some developmental stages in insects and that it is repressed at other stages. Accordingly, Karaçali *et al.* (1999) observed a reduction of 16 to 1 of sialic acids levels from larvae to adults.

When looking at the enzyme levels, several authors have shown that cultured insect cells lack terminal transferases like

¹To whom correspondence should be addressed

β 1,4-galactosyl- and sialyltransferases (Lopez *et al.*, 1999; Hooker *et al.*, 1999). Furthermore, Hooker *et al.* (1999) were unable to detect any cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid (CMP-Neu5Ac) among the nucleotide pool of uninfected cells from *Spodoptera frugiperda* (Sf9 and Sf21) and *E. acraea* (Ea4) cells, as well as in baculovirus-infected Sf21 cells.

Accordingly, insect cells are a promising model for engineering the glycosylation pathways (reviewed by Jarvis *et al.*, 1998). The first attempts to correct the glycan structures by adding mammalian glycosyltransferases were promising: the over-expression of human N-acetylglucosaminyltransferase I (GNTI) was found to lead to a fourfold increase in terminal GlcNAc residues on a baculovirus-expressed fowl plague hemagglutinin (Wagner *et al.*, 1996b). Similarly, the expression of bovine β 1,4-galactosyltransferase under the control of a viral immediate early promoter, either by the way of a baculovirus expression vector (Jarvis and Finn, 1996) or in stably transfected cells, enabled the cells to galactosylate the N-glycans on a viral glycoprotein (Hollister *et al.*, 1998) or on recombinant human transferrin (Ailor *et al.*, 2000). The elongation of N-glycans can be achieved because insect cells contain the proper sugar donors, namely, uridine diphospho-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) and uridine diphosphogalactose (UDP-Gal). However, the availability of the sialic acid donor CMP-Neu5Ac is not likely to be sufficient in cultured lepidopteran cells (Hooker *et al.*, 1999), therefore, engineering the sialylation in these cells will probably require the addition of more than one gene.

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the causing agent of Chagas disease, expresses a developmentally regulated *trans*-sialidase (TS) (reviewed by Schenkman *et al.*, 1994). This enzyme allows the parasite, which does not synthesize sialic acids, to sialylate mucin-like molecules on its surface, at the expense of glycoconjugates from the host. This sialylation is thought to have a role in adhesion of *T. cruzi* trypomastigotes to red blood cells, in the invasion (Schenkman *et al.*, 1991), and in preventing recognition by the immune system (Pereira-Chioccola and Schenkman, 1999). The enzyme has the unique property to transfer α 2,3-linked sialic acids linked to β -galactosides from various donors to an acceptor β -galactoside (Scudder *et al.*, 1993).

In this study, we developed an approach for sialylation in the baculovirus-insect cells system using a membrane-bound TS. As a first approach, *T. cruzi* TS was expressed under the control of the strong baculovirus promoter p10. We report the expression of a chimeric protein consisting in the catalytic domain of *T. cruzi* TS fused to the C-terminally located transmembrane domain of the major envelope glycoprotein gp67 (also called gp64) of the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV). The recombinant enzyme was found to be active and membrane-bound, although partially soluble, and was able to sialylate β -galactosides using fetuin or sialyllactose as sialic acid donor.

Results

Construction of a recombinant baculovirus containing a TS cDNA

The construction is schematized in Figure 1. A cDNA encoding a truncated and soluble 6-His-tagged form of *T. cruzi*

TS (Buscaglia *et al.*, 1998) was fused to a sequence encoding the last 30 amino acids of the major envelope glycoprotein of the baculovirus AcMNPV, gp67 (Whitford *et al.*, 1989), encompassing the transmembrane anchor sequence and the short cytoplasmic tail. To avoid any recombination inside the baculovirus genome, a degenerated sequence was constructed using 10 overlapping oligonucleotides. The TS sequence was inserted downstream of a sequence encoding a signal peptide from another baculovirus gene (the gene for ecdysteroid glycosyltransferase of AcMNPV, O'Reilly and Miller, 1989). The final construction was inserted into the p10 locus of a baculovirus expression vector, AcSLP10 (Chaabihi *et al.*, 1993). Following the procedures described in Materials and Methods, we obtained a recombinant baculovirus, AcP10TS, which was used for all subsequent experiments.

Time course analysis of the recombinant TS expression

The expression of the TS was monitored during the course of infection by assaying its capacity to transfer Neu5Ac residues onto lactose. The amounts of TS activity were examined in lysates of cells infected with the recombinant baculovirus AcP10TS and in a suspension of intact, washed cells. Fetuin was used as the sialic acid donor because it is a nonpermeant glycoprotein, rich in α 2,3-linked Neu5Ac, thus allowing to measure the plasma membrane-bound activity. This activity was found to represent one third to one half of the total activity found in the lysates (Figure 2). Both activities were detectable as early as 24 h after infection and were maximal and reached a plateau at 48 h postinfection (p.i.), which was consistent with an expression under the control of the late promoter p10 (Quant-Russell *et al.*, 1987). An increasing TS activity was also detected in the medium after 24 h p.i. This activity was approximately as high as the activity in the lysates 3 days after infection. In contrast, no TS activity was detectable in AcSLP10-infected Sf9 cells.

Western blot analysis of the recombinant TS

A rabbit polyclonal antibody directed against the catalytic domain of TS was produced by immunization of a rabbit with a bacteria-expressed, 6-His-tagged TS. This antibody was used for detection of the TS protein in the cell lysates (Figure 3A). The antibody was found to be highly specific for the TS. The protein could be detected in the lysates of AcP10TS-infected Sf9 cells but not in Sf9 cells infected with the control baculovirus, AcSLP10. The predicted molecular weight of the protein after cleavage of the signal peptide was approximately 75 kDa. As expected, the TS migrated with an apparent molecular weight close to the migration of human apotransferrin (79 kDa). Because the TS sequence contained two potential N-glycosylation sites, peptide N-glycanase F (PNGase F) digestion was performed. This resulted in a shift down of the TS to a size of about 75 kDa, indicating that at least one N-glycosylation site was occupied and that the protein was correctly addressed to the plasma membrane via the secretion pathway.

Flow cytometry analysis of TS membrane expression

To obtain a plasma-membrane TS activity, the catalytic domain was fused with a transmembrane segment from the baculovirus envelope glycoprotein gp67. To check for the correct location of the enzyme, the expression of the TS construction was analyzed by fluorescence-assisted cell

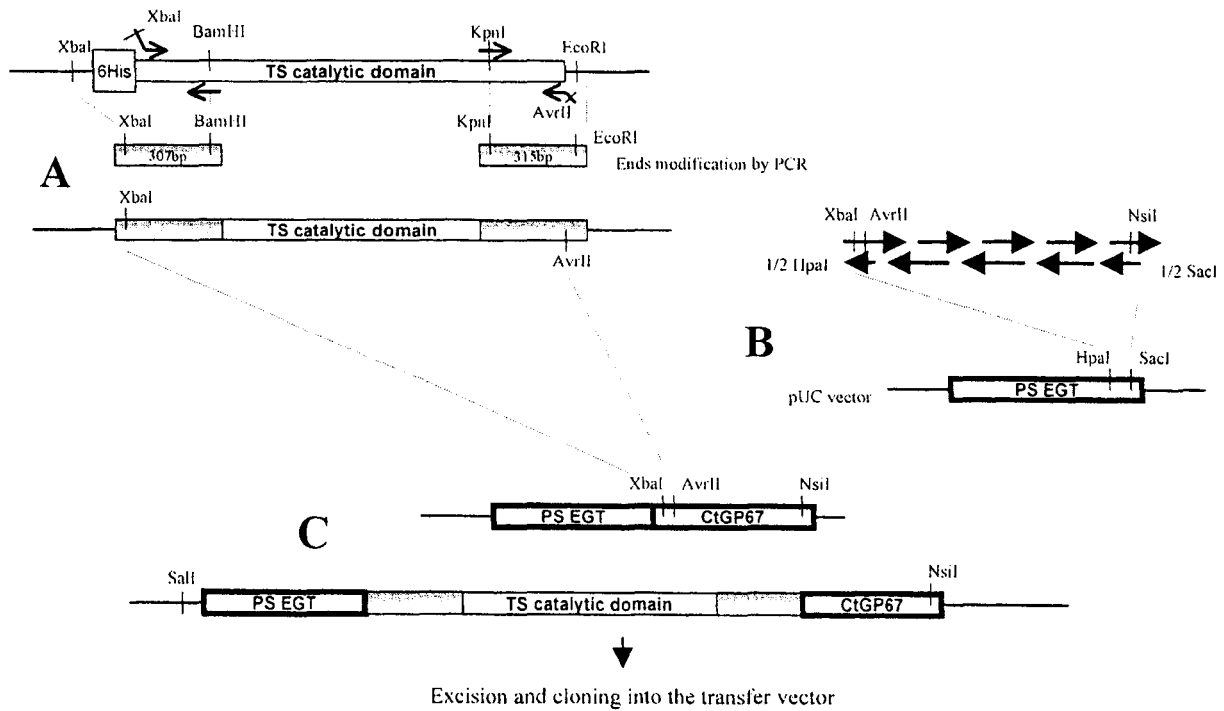


Fig. 1. Construction of the recombinant baculovirus. (A) The cDNA encoding a 6-His-tagged truncated form of *T. cruzi* TS was used as a template for PCR to generate modified cDNA ends containing additional restriction sites. The modified 5' end (307 bp) and the modified 3' end (315 bp) were sequenced and reinserted into the TS sequence using the indicated restriction sites. (B) The C-terminal sequence from gp67 gene containing the transmembrane domain and the cytoplasmic tail (CtGP67, 135 bp) was reconstituted using 10 overlapping oligonucleotides (indicated as arrows), inserted into a pUC vector containing the signal sequence from ecysteroid glucosyltransferase (PS EGT) and sequenced. (C) The modified TS sequence was excised and inserted between PS EGT and CtGP67. After sequencing the construction was cloned into the p119 transfer vector.

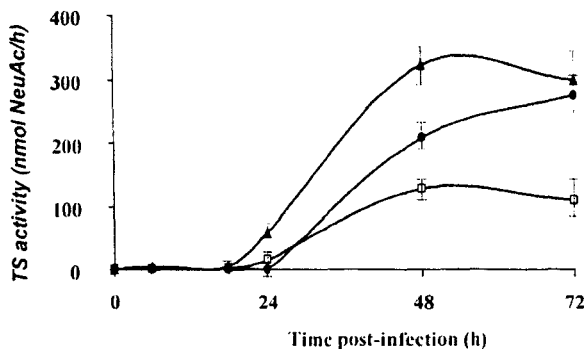


Fig. 2. Time-course analysis of TS expression. Sf9 cells (10^6 cells) were infected with AcP10TS. At various times p.i., the TS activity was assayed as described in *Materials and methods* in the lysates (filled triangles), in the infection medium (filled circles) or in a suspension of intact cells (open squares). The data are representative of two independent experiments and are given for 10^6 cells. Vertical bars indicate the standard deviation for the TS activity measurements performed in triplicate in one set of experiment.

sorting. Cells infected by AcP10TS or by the control baculovirus AcSLP10 were analyzed using the polyclonal antibody. As shown in Figure 4, a clear shift of the fluorescence was observed after incubation of AcP10TS-infected cells with the anti-TS antibody, as compared to incubation with the preimmune serum, and this shift was not observed for

AcSLP10-infected Sf9 cells. It has to be noted that for AcSLP10-infected cells, the presence of polyhedrin crystals dramatically change the physical properties of the cells, and this significantly alter the background fluorescence. The permeabilization of the AcP10TS-infected cells prior to incubation with the antibodies did not significantly modify the shift, suggesting that the majority of TS activity associated to the cells was bound to the plasma membrane.

Analysis of the TS activity on extracellular viral particles

As observed in Figure 2, an increasing activity was detected in the infection medium. This infection medium contained the extracellular viral particles but also the proteins released by secretion or by cell lysis. As demonstrated by flow cytometry analyses, the TS was membrane-bound, thus we expected that it could be recovered on viral particles. To test this possibility, the extracellular viral particles were isolated from an infection medium at 3 days p.i. by ultracentrifugation. After centrifugation 20 min at $50,000 \times g$ the viral pellet was found to contain TS activity, but a 200-fold higher activity was found as soluble material in the clarified medium. When the pelleted viral particles were analyzed by ultracentrifugation in a sucrose density gradient, a peak of TS activity coincided with the major envelope glycoprotein of the baculovirus, gp67, detected by western blot (Figure 5), indicating that TS was associated to the extracellular viral particles. But again, a part of the activity did not penetrate the gradient and remained in

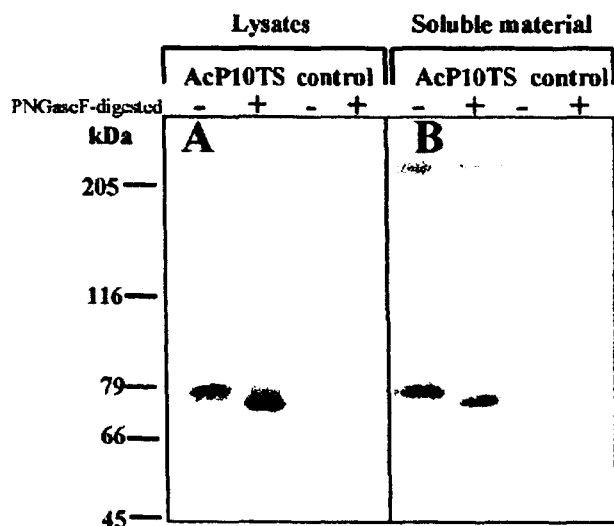


Fig. 3. Western blot analysis of the TS in lysates and in the medium. Sf9 cells adapted to EXTRA SB5 serum-free medium were infected by AcP10TS or by AcSLP10 (control). At 3 days p.i., the cells were lysed and the infection media were collected, clarified by ultracentrifugation at $50,000 \times g$ for 20 min to eliminate the viral particles and concentrated. Both lysates (A) and supernatants (B) were analyzed by western blot using an anti-TS antibody and a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. The immunoreactive bands were revealed by chemiluminescence. The molecular mass standards are indicated on the left. The 79-kDa standard corresponds to human apotransferrin. The samples were treated with PNGase F (+) or with the buffer only (-) before SDS-PAGE.

the top fractions, indicating that it was not incorporated into the viral envelopes.

Analysis of the TS activity in the clarified infection medium

Because the major part of the TS activity measured in the infection medium was not associated with the viral particles, one hypothesis could be that part of the cellular TS activity was released into the medium after a proteolytic cleavage. However, as shown in Figure 3B, the western blot analysis after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the clarified infection medium clearly indicated that the TS had the same apparent molecular weight as the cellular protein; in addition, its susceptibility to PNGase digestion showed that it was also N-glycosylated.

Another hypothesis to explain this soluble TS activity could be its incorporation into vesicular membranes or exosomes (Trams *et al.*, 1981). To determine if this could be the case, the clarified infection medium was submitted to ultracentrifugations at increasing forces, and the TS activity remaining in the supernatant was assayed (Figure 6A). We observed that even after a 15 h centrifugation at $100,000 \times g$, a condition where all potential vesicles should be sedimented, 60% of the TS activity remained in the supernatant. Similarly, after filtration through a 0.22- μm filter, which should retain the vesicular material, 90% of the TS activity was recovered in the filtrates (Figure 6B). Taken together, these results strongly indicate that the TS activity in the infection medium was mainly present as a soluble protein and not integrated into exosomes. Because this protein possesses the hydrophobic tail from gp67, it could

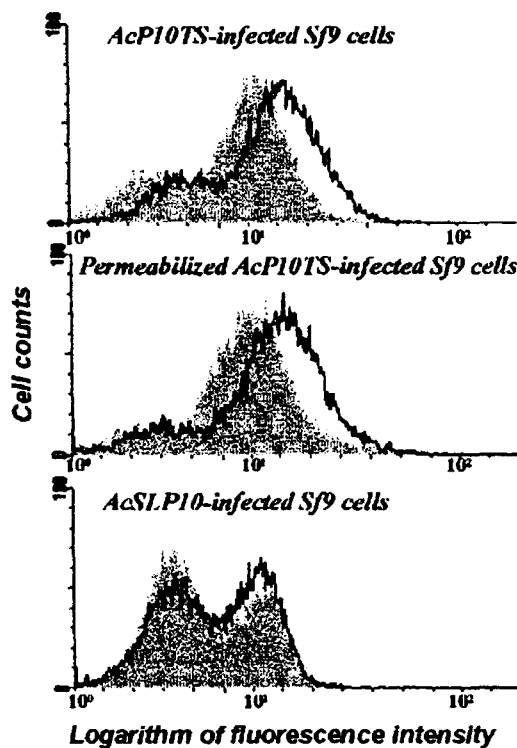


Fig. 4. Flow cytometry analysis of TS membrane expression. Sf9 cells were infected with AcP10TS or with the control virus AcSLP10. The TS was detected by flow cytometry on intact AcP10TS-infected cells (top panel), on ethanol-permeabilized AcP10TS-infected cells (middle panel), or on intact AcSLP10-infected cells (bottom panel). At 2 days p.i., the cells were harvested, washed, and incubated with a rabbit immune serum against TS (black open peaks) or with the preimmune serum (filled peaks) and with a secondary anti-rabbit antibody (FITC conjugated).

be able to form stable aggregates. To test this possibility, the proteins contained in the clarified infection medium were resolved on a nondenaturing PAGE and the TS was detected by western blot. Figure 6C shows that the immunoreactive material could penetrate into the gel, remaining in the upper part. This result shows that the TS present in the clarified infection medium was not associated to vesicles but rather was present as aggregates of very high molecular weight.

Sialylation of galactosylated acceptors

The aim of this study was to evaluate the possibility to use *T. cruzi* TS as a tool for sialylation of glycoconjugates in the baculovirus-insect cells system. To test the efficiency of this enzyme and in a first approach, we used exogenous galactosylated acceptors added in the culture medium, with either fetuin or sialyl- α 2,3-lactose as sialic acid donors.

In a first experiment, Sf9 cells were infected with AcP10TS, and 1 day after infection the medium was replaced by a fresh medium containing 3 mg/ml fetuin and 0.2 mg/ml lactose. Figure 7A shows the paper chromatography analysis of the medium after a 24-h incubation (i.e., 2 days p.i.). More than 30% of the lactose was converted to sialyllactose, that is, approximately 600 μg of sialyllactose was produced in 24 h by 5×10^6 infected cells.

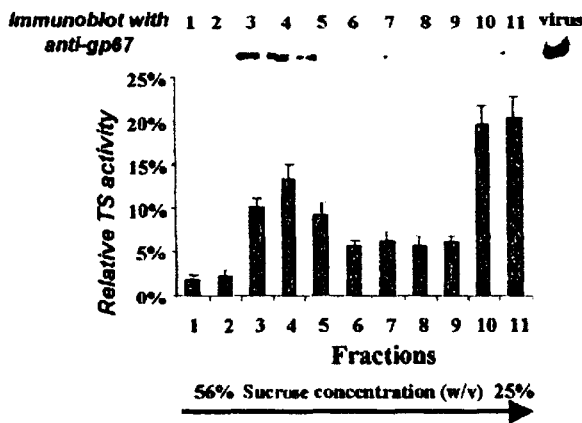


Fig. 5. Analysis of the TS activity in the infection medium. Sf9 cells were infected with AcP10TS, and the infection medium was collected at 3 days p.i. and submitted to an ultracentrifugation at $50,000 \times g$ for 20 min to obtain a pellet of viral particles. AcP10TS viral particles were then submitted to an ultracentrifugation through a 25–56% sucrose gradient (w/v). Each fraction was assayed for TS activity. The data are expressed as percentage of the input activity, vertical bars indicate the standard deviation for triplicate determination of the TS activity. Each fraction was analyzed by western blot after SDS–PAGE with an antibody against gp67. As a control, an aliquot of the viral pellet was also analyzed by western blot (lane virus).

Finally, we tested the possibility to sialylate N-glycans. For this purpose, Sf9 cultured in serum-free medium were infected with AcP10TS, and 1 day after infection the medium was replaced by a fresh medium containing 1 mM sialyl- α 2,3-lactose and 1 mg/ml desialylated α 1-acid glycoprotein (α 1-AGP). Figure 7B shows the time course analysis of the sialylation of asialo- α 1-AGP revealed by lectin blotting with *Maackia amurensis* agglutinin (MAA). It clearly appears that asialo- α 1-AGP acquired α 2,3-linked sialic acids. The specificity of the lectin is demonstrated by the absence of signal when the resialylated α 1-AGP was treated with *C. perfringens* sialidase before SDS–PAGE. Controls were performed in the absence of asialo- α 1-AGP, in the absence of sialyl- α 2,3-lactose and with AcSLP10-infected cells incubated with both the donor and the acceptor. No sialylation was observed with any of these controls, demonstrating that the TS uses sialyllactose to sialylate the desialylated α 1-AGP in the culture medium.

Discussion

Recent reports, summarized by Jarvis *et al.* (1998), have shown that engineering the N-glycosylation pathway in the baculovirus–insect cells expression system can be considered. The obtention of baculovirus-expressed glycoproteins carrying mammalian-type N-glycans up to the galactose can reasonably be hoped for in the near future. However, the problem of the sialylation is not resolved because cultured insect cells do not display significant amounts of the donor CMP-Neu5Ac (Hooker *et al.*, 1999). This result predicts that the addition of more than one gene will be needed to allow the sialylation in insect cells. This point of view is still contradictory, since Hollister and Jarvis (2001) have recently obtained a stably transformed insect cell line, Sf β 4GalT/ST6, possessing the

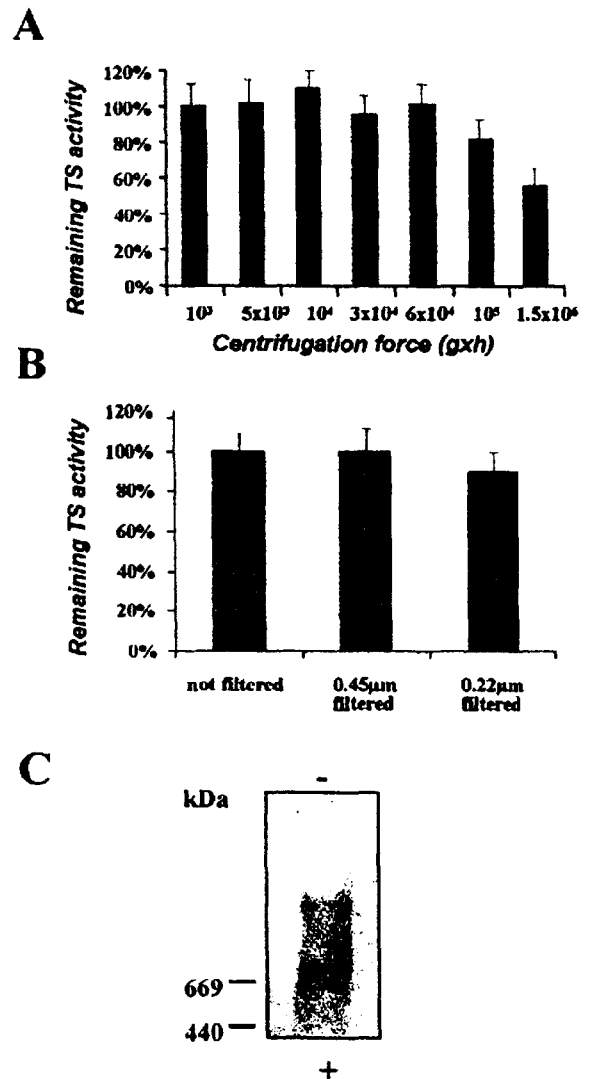


Fig. 6. Analysis of the soluble TS activity. Sf9 cells were infected by AcSLP10. At 3 days p.i., the infection medium was collected, clarified by ultracentrifugation at $50,000 \times g$ for 20 min to eliminate the viral particles and (A) submitted to increasing centrifugation forces (from $10^3 \times g \times h$ to $1.5 \times 10^5 \times g \times h$). After each centrifugation an aliquot of the supernatant was assayed for TS activity. The data are representative of two independent experiments and are expressed as the remaining TS activity in the supernatant after centrifugation. The vertical bars indicate the standard deviations of triplicate TS assays. (B) The clarified infection medium was filtered through 0.45- and 0.22- μ m filters and the TS activity was assayed in the filtrates. The data are expressed as percentages of TS activity remaining in the filtrates (taking the unfiltered activity as 100%). The vertical bars indicate the standard deviations of triplicate TS assays. (C) Native gel electrophoresis of the soluble TS. Sf9 cells grown in EXTRA SB5 were infected with AcP10TS; at 3 days p.i. the infection medium was clarified and concentrated. An aliquot was analyzed by PAGE under native conditions and revealed by western blot.

mammalian cDNAs for a β 1,4-galactosyltransferase and an α 2,6-sialyltransferase, which is able to transfer α 2,6-linked Neu5Ac onto a baculoviral glycoprotein.

This study was aimed to explore another possibility for the sialylation in the baculovirus system using *T. cruzi* S. This

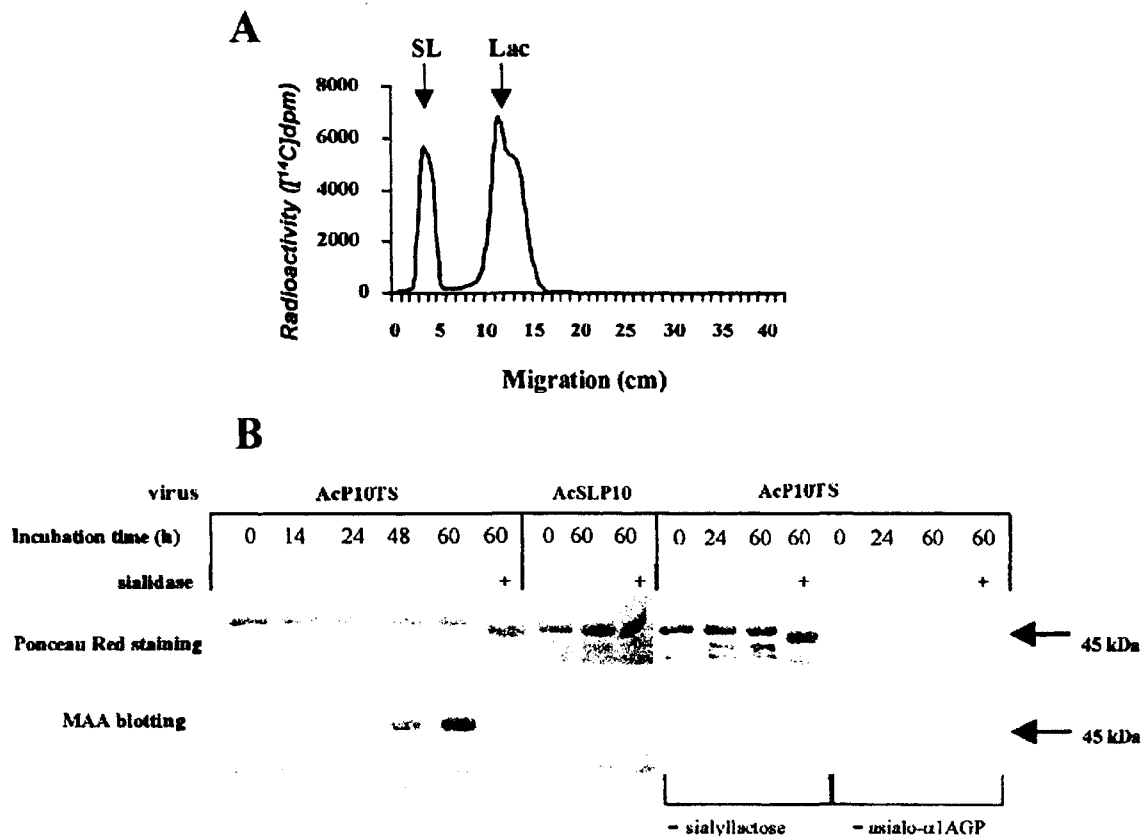


Fig. 7. Sialylation of galactosylated exogenous acceptors. (A) 5×10^6 Sf9 cells were infected with AcP10TS and at 24 h p.i. the medium was replaced by a fresh medium containing 15 mg fetuin and 1 mg lactose (2×10^6 d.p.m. of [^{14}C]lactose as marker). After a 24-h incubation an aliquot of the medium was analyzed by descending paper chromatography according to *Materials and methods*. The radioactivity was analyzed along the chromatographic path. The positions of authentic standards are indicated by arrows (SL, sialyllactose; Lac, lactose). (B) Sf9 cells grown in EXTRA SB5 serum free medium were infected with either AcSLP10 or AcP10TS. At 24 h p.i. the infection medium was replaced by fresh medium containing 1 mM sialyl- α 2,3-lactose and 1 mg/ml asialo- α 1AGP. Controls were performed without sialyllactose or without asialo- α 1AGP. At various times p.i. aliquots of the medium were analyzed by SDS-PAGE and blotted. The proteins were visualized by Ponceau red staining (top panel) and α 2,3 sialyl residues were revealed by digoxigenin-conjugated MAA (bottom panel). + indicates that the samples were treated with *C. perfringens* sialidase before electrophoresis.

enzyme, which has a unique catalytic activity, has been extensively studied (Schenkman *et al.*, 1994), and several groups are concerned with the exploitation of this activity *in vitro* (Tomlinson *et al.*, 1992; Ito and Paulson, 1993).

Due to the surface expression of this enzyme, *T. cruzi* is able to sialylate mucin-like acceptors using circulating or cellular donors. Our idea was to mimic this property of the parasite in insect cells. To achieve this purpose, the catalytic domain of the enzyme was fused to the transmembrane domain of gp67. The envelope fusion protein gp67 or gp64 has been shown to drive the viral budding (Oomens and Blissard, 1999) and to be the main insect cell receptor (Hefferon *et al.*, 1999). An envelope fusion domain and a trimerization domain have been defined in the gp67 ectodomain, and a number of mutations in the ectodomain result in viruses with reduced infectivity (Monsma and Blissard, 1995). In contrast, the deletion of the C-terminal cytoplasmic tail did not significantly modify the infectivity or the virions production (Oomens and Blissard, 1999), suggesting that this sequence does not play any essential role in the virion assembly. Therefore, it was postulated in this study that the addition of only the transmembrane sequence and the

cytoplasmic tail, that is, the last 30 amino acids of AcMNPV gp67 sequence (Whitford *et al.*, 1989), would direct the chimeric protein to be integrated in the plasma membrane and not specifically in the envelope of the virus. Our strategy was different from the baculovirus display strategy (Boublik *et al.*, 1995; Grabherr *et al.*, 1997; Ernst *et al.*, 2000), which takes advantage of the specific integration of gp67 into the viral envelope to express proteins on the surface of budded virions. However, because the envelope of budded virions is known to derive from the cytoplasmic membrane of infected cells, it was expected that the TS construction would also be present in the viral envelope. In fact, after sedimentation of the viral particles through a sucrose gradient, we were able to detect TS activity in the virus-containing fractions.

When the chimeric TS was overexpressed under the control of the p10 promoter in Sf9 cells, the TS activity recovered was mainly associated with the cells and in the infection medium. Because in the flow cytometry experiments the expression of the TS was comparable for intact and permeabilized AcP10TS-infected cells, we concluded that the majority of the

cellular TS was bound to the plasma membrane. Only a minor part seemed to be associated with virus budding.

It was more surprising to observe that an equal amount of TS activity was found on the plasma membrane and as soluble material in the infection medium, even after high-speed centrifugations in the conditions used to pellet the viruses. It was first thought that the protein was shed from the cell surface by a proteolytic cleavage resulting in an active, truncated form of the enzyme. But after SDS-PAGE and western blot analysis we could not detect any difference in the size of the protein found in cell lysates and in the infection supernatants. Therefore, another possible explanation for this soluble activity could be the incorporation of the TS, through the hydrophobic segment from gp67, into vesicles exfoliated from the cellular membrane. This exfoliation process was first observed by Trams *et al.* (1981) who proposed the name of exosomes for these vesicles. However, taking their experimental conditions (ultracentrifugation and ultrafiltration), we were unable to characterize the association of soluble TS activity with exosomes. Furthermore, an electrophoresis under native conditions showed that the TS could penetrate into the gel and confirmed that the enzyme was not linked to vesicular membranes. Our interpretation is that the TS synthesized in the endoplasmic reticulum follows the secretion pathway, because both cellular and soluble forms are N-glycosylated. Due to the overexpression driven by the p10 promoter, a part of the glycoprotein remains plasma membrane-associated, while an other part is released as aggregates. Indeed, the time-course analysis shows that the TS associated to the membranes rapidly reaches a plateau, whereas the released activity continuously increases during the infection. The plasma membrane-bound activity was found to represent one third to one half of the total cellular activity as assayed in the lysates, and this appears not to be in agreement with the flow cytometry analyses, which indicated that the majority of the TS was bound to the plasma membrane, because no difference in the antibody fixation was observed for permeabilized cells as compared with intact cells. One possible explanation is that a part of the intracellular TS activity is soluble and hence is lost after permeabilization. But this discrepancy may also reflect a difference in activity or in substrate accessibility between the solubilized and membrane-bound forms of the enzyme.

More important is the observation that the expression of a TS in the baculovirus system enables the insect cells to sialylate exogenous galactosylated acceptors, such as lactose and asialo-N-glycans. But further efforts should concern the optimization of the model. The first point to consider is that in this study the TS was overexpressed under the control of a strong late promoter. Because this could affect the synthesis of a glycoprotein of interest, it could be useful to express the TS under the control of a moderate and early promoter (for review, see Jarvis *et al.*, 1990). The second point is that we were only concerned to sialylate exogenous galactosylated acceptors, because Sf9 cells do not produce significant amounts of galactose-terminated glycoproteins. As discussed above, the expression of TS in insect cells engineered to extend the glycosylation pathway up to the galactose seems to be a key point. Future studies should concern the coexpression of a β -galactosyltransferase in combination with the TS, together with a glycoprotein of interest. Alternatively, it could be interesting to express the TS in insect cell lines that are known to

synthesize higher levels of galactosylated glycoproteins, such as Ea4 or High Five cells.

Another essential improvement concerns the efficiency of the TS reaction and the optimization of the sialylation levels. The choice of the most appropriate sialic acid donor seems to be crucial. Several requirements have to be addressed. First, the donor will have to allow an easy purification of the glycoprotein of interest. For example, a variety of low molecular weight or insolubilized sialic acid donors can be substrates for the TS. A good donor should also be cost-effective. Finally, the quality of the donor and the ratio donor versus acceptor have to be tested for optimal sialylation levels.

Though a major limitation for sialylation of recombinant glycoproteins using TS is that it transfers only α 2,3-linked sialic acids, the main advantage is that a variety of acceptor motifs, including O- and N-glycans, can be sialylated. This is generally not the case with sialyltransferases, as these enzymes have a very high specificity toward the acceptor (for a review, see Harduin-Lepers *et al.*, 1995). Moreover, the strategy, which uses *in vitro* sialylation of the purified glycoprotein by a sialyltransferase, is constrained by the cost of CMP-NeuAc, which is the exclusive donor for this family of enzymes.

Although the recent study of Hollister and Jarvis (2001) reports that the coexpression of a β 1,4-galactosyltransferase and an α 2,6-sialyltransferase in a stably transformed cell line derived from Sf9 allows the sialylation of a recombinant glycoprotein, the way by which CMP-NeuAc is synthesized remains unclear. In addition, the sialylation levels reached in this system presumably are limited by the CMP-NeuAc availability. Therefore, the *trans*-sialidase appears to be a potential alternative for the production of α 2,3-sialylated glycoproteins in the baculovirus-insect cells system.

Materials and methods

Cells and viruses

Spodoptera frugiperda Sf9 cells (ATCC CRL 1711) were maintained at 28°C in EXTRA 1× medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco BRL Life Technologies, France), and antibiotics: penicillin (3.5 mM) and streptomycin (35 μ M) (both from Sigma, St. Louis, MO) or in a serum-free medium, EXTRA SB5 (Eurobio), supplemented with cholesterol (4 mg/l, Sigma) and antibiotics. The cells were cultured as monolayers and subcultured twice a week.

The viruses were propagated in Sf9 cells, and all procedures were done essentially as described by Summers and Smith (1987). For infection, cells were inoculated with a viral suspension at multiplicities of infection (MOIs) of 5–10 PFU/cell. After a 1-h adsorption at room temperature, the viral inoculum was removed and fresh culture medium was added. Infected cells were further incubated at 28°C for various times. The viral titers were determined by plaque assay.

Construction of the recombinant baculovirus

The cDNA encoding a 6-His tagged truncated form of *T. cruzi* *trans*-sialidase (GenBank accession number L26499), cloned in the EcoRI site of the pTrcHisA vector (Invitrogen, The Netherlands) was a kind gift of Dr A.C.C. Frasch (see Buscaglia *et al.*, 1998). This plasmid served as a template for

polymerase chain reaction (PCR) to generate modified ends of the TS sequence (Figure 1), using primers from Eurogentec (Belgium) and the VENT polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA). Oligonucleotides TST1 (5'-CGA-TTC-TAG-ACT-GGC-ACC-CGG-ATC-GAG-CCG-AGT-TGA-3') and TST2 (5'-CAC-TGT-GGG-ATC-CAC-CAC-ACG-AGA-AAC-AGA-3') were designed for generation of a modified 5' end containing an additional XbaI site and deleted of the 6-His tag. The amplified fragment (307 bp) was excised from the agarose gel and cloned into a pBlueScript plasmid for sequencing using the T7 polymerase kit from Pharmacia (Uppsala, Sweden) and $d[^{35}\text{S}]\text{ATP}$ from Amersham (UK). The obtained plasmid was then digested by XbaI and BamHI. The digestion fragment was reinserted into pTrcHisATS to generate pTrcHisATSt. Oligonucleotides TSQ1 (5'-GGG-TAA-GAG-GTA-CCA-CGT-CGT-TCT-3') and TSQ2 (5'-CTG-AGA-ATT-CCT-AGG-GCA-CTC-GTG-TCG-CTG-CTG-CTG-TC-3') were used for generation of a modified 3' end containing an additional AvrII site and deleted of the stop codon. The amplified 315-bp-long fragment was excised from the gel and cloned into a pUC19 plasmid for sequencing. The KpnI-EcoRI fragment was then reinserted into pTrcHisATSt to generate pTrcHisATStq.

A degenerated sequence encoding the C-terminal transmembrane domain from the baculovirus envelope glycoprotein gp67 (Whitford *et al.*, 1989, GenBank accession number M25420) and containing unique restriction sites at both ends was constructed using a set of 10 overlapping oligonucleotides. The dephosphorylated oligonucleotides were denatured by heating, mixed, and allowed to renature overnight. The resulting fragment (135 bp long) was cloned into a HpaI/SacI-cut pUC vector carrying the signal sequence from the ecdysteroid glucosyltransferase gene of the baculovirus AcMNPV (O'Reilly and Miller, 1989, GenBank accession number M22619). Several independent clones obtained after ligation and transformation of *Escherichia coli* were sequenced, and one clone was found to contain the right sequence.

The modified TS sequence was excised by XbaI/AvrII digestion and inserted between the signal peptide and the transmembrane sequence. The final construction was then subcloned into the transfer vector p119, designed for insertion into the p10 locus of the baculovirus.

Sf9 cells were cotransfected by lipofection (Felgner and Ringold, 1989) using DOTAP (Boehringer Mannheim, Germany) with p119-TS and genomic DNA of the modified baculovirus AcSLP10. AcSLP10 is derived from wild-type AcMNPV and possesses only one strong promoter, p10, with the polyhedrin coding sequence inserted downstream of this promoter (Chaabihi *et al.*, 1993). Thus, it has an occlusion body-positive phenotype, whereas the recombinant virus is occlusion body-negative. The screening and purification of the recombinant baculovirus AcP10TS were carried out as described by Summers and Smith (1987).

Production of the antibodies

E. coli strain DH5 α bacteria were transformed with pTrcHisATS, cultured in 200 ml LB medium with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ampicillin and induced by 1 mM isopropyl β -D-thiogalactoside (Sigma) when the optical density reached 0.6. After a 4-h induction at 30°C, cells were harvested, washed in a cold Tris buffer (pH 7.5) with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and were lysed using a French press at a pressure of

10,000 psi. After centrifugation and SDS-PAGE analysis, the pellet was found to contain the TS. The pellet was resuspended in denaturing buffer (urea 8 M, NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, pH 8, PMSF 1 mM). Then the 6-His-tagged TS was batch-purified using an Ni-NTA-agarose resin (Qiagen GmbH, Germany) as described in the manufacturer's protocol. Each fraction was analyzed by SDS-PAGE; the fractions containing the pure TS were pooled, dialyzed against water, and lyophilized. An approximate yield of 800 μg was obtained and used for immunization of a rabbit by three successive injections.

The antiserum was collected 8 weeks after the first injection, and the antibodies were precipitated with ammonium sulfate and resuspended in a half volume of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) and dialyzed. The specificity of the antibodies was evaluated by western blot analysis (not shown).

TS assays

For TS assays, we used a protocol in which the sialic acid donor was fetuin (rich in α 2,3-linked sialic acids) and the acceptor was [^{14}C]-labeled lactose (Amersham, UK). Each assay contained 1 mM lactose (0.4 μCi) and 20 mg/ml fetuin (Sigma, Neu5Ac content approximately 5%) in a final volume of 100 μl in PBS pH 7.2, with or without 0.5% Triton X100. The incubations were performed at 28°C for 1 h, then the macromolecules were precipitated by the addition of 900 μl cold ethanol. Following centrifugation, the supernatants were dried under nitrogen flow and resuspended in 70% ethanol, and the labeled compounds were separated by paper electrophoresis as described by Leguizamon *et al.* (1994). Sialyl-lactose and lactose could also be separated by descending paper chromatography in the following solvent: pyridine/ethyl acetate/acetic acid/water 5/5/1/3 (by volume).

For analysis of the TS activity in cell lysates, the infected cells were harvested, washed with cold PBS pH 7.2, and lysed in the lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X100) and the TS assay was performed as described above.

For analysis of the membrane-bound activity, the infected cells were harvested, washed with cold PBS pH 7.2, and resuspended in PBS. The assay was carried out as described above with this cell suspension (without Triton X100). The cell viability was estimated by Trypan blue exclusion to be around 90%.

For analysis of the soluble activity, the infection medium was clarified by centrifugation 20 min at 50,000 $\times g$ in a SW41TI rotor at 4°C. The clarified infection medium was then centrifuged at various speeds and for various times in a SW41TI rotor at 4°C, and the supernatants were assayed for TS activity as above. The clarified infection medium was also filtered through 0.45- and 0.22- μm filters (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) and the filtrates were assayed for TS activity.

When asialo- α 1-AGP was used as sialic acid acceptor, the desialylation was carried out by incubation of human α 1-AGP (Sigma) with 3 M acetic acid at 80°C for 3 h, and the desialylation was checked by gas-liquid chromatography. Pure sialyl- α 2,3-lactose was the kind gift of Dr. Gérard Strecker.

Flow cytofluorimetry analysis

Sf9 cells grown in EXTRA 1 \times medium were infected with the recombinant baculovirus AcP10TS or with the control

baculovirus AcSLP10. The cells were harvested at 48 h p.i. and washed three times in cold PBS, then incubated with the antibody or with the preimmune serum diluted in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h in ice. Cells were washed then incubated 1 h with the secondary antibody: fluorescein conjugated anti-rabbit (Sigma) diluted in PBS-BSA. Then the cells were analyzed in a FACScalibur (Beckton Dickinson, Sunnyvale, CA).

Permeabilization of the cells prior to incubation with the antibodies was performed by incubating the cells for 2 h in ice-cold 70% ethanol at a temperature of -20°C . Then the cells were washed three times with cold PBS and incubated with the antibodies as described above.

Preparation of viral particles and sedimentation on sucrose gradient

Sf9 cells cultured in EXTRA 1 \times medium were infected with AcP10TS in a 75-cm² T-flask. Three days after infection, the medium was collected and the viral particles were pelleted by ultracentrifugation at $50,000 \times g$ for 20 min at 4°C (according to Loisel *et al.*, 1997). The supernatant was saved and assayed for TS activity. The pellet was resuspended in cold PBS and centrifuged at low speed to eliminate any cellular debris. This supernatant was then pelleted by another ultracentrifugation at $50,000 \times g$ for 20 min at 4°C . The pellet was resuspended in 1.2 ml of TE buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) containing 1 mM PMSF (Sigma), assayed for TS activity, and layered onto a linear continuous sucrose gradient (25–56% w/v in TE buffer). The gradient was centrifuged at $100,000 \times g$ for 90 min in a SW41TI rotor at 4°C . Fractions were collected from the bottom to the top of the gradient, dialyzed against water, and assayed for TS activity as described. An aliquot of each fraction was analyzed by SDS-PAGE, and western blot analysis was performed using a mouse monoclonal antibody against gp67, the major envelope glycoprotein of the baculovirus. This anti-gp67 antibody (AcV5, Hohmann and Faulkner, 1983; Monsma and Blissard, 1995) was a kind gift of Dr. G.W. Blissard. The secondary antibody was a goat anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase (Sigma). The immunoreactive bands were detected by chemiluminescence.

Western blot analysis of the recombinant TS

To allow an easier detection, Sf9 cells adapted to a serum-free medium, EXTRA SB5 supplemented with cholesterol, were used for western blot analysis. Sf9 cells adapted to this medium were infected with AcP10TS or with the control AcSLP10 at MOIs of 10. At 3 days p.i., the cells were harvested and lysed in the lysis buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X100) and assayed for TS activity. The infection supernatants were clarified by centrifugation at $50,000 \times g$ for 20 min at 4°C and concentrated five times using a Microsep unit (Pall Gelman Sciences). PNGase F digestions were carried out according to the manufacturer's protocol (New England Biolabs). The samples were first denatured 10 min at 100°C in denaturing buffer (0.5% SDS, 1% β -mercaptoethanol), then the incubations were carried out for 1 h at 37°C with 15 mIU PNGase F in the incubation buffer (sodium phosphate 0.05 M, pH 7.5) with 1% NP40. Control samples were denatured similarly and treated with the buffer only. Finally, the samples

were placed in Laemmli buffer, boiled, and ran on denaturing gel electrophoresis (Laemmli, 1970). Proteins were electrotransferred to nitrocellulose sheets (Schleicher & Schuell, Germany), and visualized by Ponceau red staining (Sigma). The nitrocellulose membranes were blocked in 2% gelatin (Sigma) in Tris buffered saline (TBS) buffer (Tris-HCl 15mM, pH 8, NaCl 140 mM, 0.05% Tween 20). The proteins were detected by using the polyclonal anti-TS antibody as the primary antibody (1/10,000 in TBS buffer) and a goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Dako, Glostrup, Denmark, 1/1000 in TBS buffer). The immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using an ECL kit from Pharmacia (Uppsala, Sweden).

Native gel electrophoresis

For nondenaturing gels, the samples were placed in a sample buffer (187 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1% sucrose, 0.005% bromophenol blue) and ran in a 5–15% gradient gel without SDS in the electrophoresis buffer (Tris-HCl, 0.025 M, glycine 0.2 M, pH 8.5). The western blot was performed as above.

Lectin blotting

After SDS-PAGE and electrotransfer as described above, the nitrocellulose sheets were blocked in polyvinylpyrrolidone (2% in TBS buffer), then incubated with digoxigenin-conjugated MAA (specific for α 2,3-linked sialic acids); blocked again in blocking reagent; incubated with Fab-anti-digoxigenin fragments, conjugated to alkaline phosphatase, and finally revealed with nitroblue tetrazolium chloride-5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (all reagents from Boehringer Mannheim). Control samples were treated before SDS-PAGE with 50 mU/ml *C. perfringens* sialidase (Sigma) in 100 μ l of incubation buffer (sodium citrate 50 mM, pH 6, NaCl 0.9%, CaCl₂ 0.1%) for 1 h at 37°C .

Acknowledgments

This work was initiated by Dr. André Verbert and we wish to dedicate it to his memory. André Verbert died on 20 May 2000. We miss his friendship and enthusiasm. We are very grateful to Dr. A.C.C. Frasch (University of Buenos Aires) for his kind gift of the *trans*-sialidase cDNA and to Dr. G.W. Blissard (Boyce Thompson Institute, Cornell University, Ithaca, NY) for the gift of the AcV5 antibody. We sincerely acknowledge Dr. Philippe Delannoy for helpful discussions. We are indebted in Dr. Joël Mazurier for the cytofluorimetry experiments, Jean-Pierre Decottignies for the immunization of a rabbit, Dr. Jean-Pierre Bohin for the bacterial cultures, and Dr. Gérard Strecker for gift of the sialyllactose. We also sincerely thank the members of the Station de Pathologie Comparée, Unité Mixte de Recherche INRA/CNRS/Université de Montpellier II no. 5087 and of the Unité Mixte de Recherche du CNRS no. 8576, particularly Dr. Sandrine Duvet, Dr. Frédéric Chirat, and François Foulquier for their help and support. This work has been supported by the Université des Sciences et Technologies de Lille, by the Ministère de la Recherche and by the Centre National de la Recherche Scientifique, "Programme Interdisciplinaire Physique et Chimie du Vivant, Réseau GT-rec."

Abbreviations

α 1-AGP, α 1-acid glycoprotein; AcMNPV, *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus; BSA, bovine serum albumin; CMP-Neu5Ac, cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid; EGT, ecdysteroid glucosyltransferase; GNTI, β -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I; MAA, *Maackia amurensis* agglutinin; MOI, multiplicity of infection; PBS, phosphate buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; p.i., post-infection; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PNGase, peptide N-glycanase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TBS, Tris buffered saline; TS, *trans*-sialidase; UDP-Gal, uridine diphosphogalactose; UDP-GlcNAc, uridine diphospho-N-acetylglucosamine.

References

- Ailor, E., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Masuda, K., Rahman, B.A., Jarvis, D.L., Lee, Y.C., and Betenbaugh, M.J. (2000) N-glycan patterns of human transferrin produced in *Trichoplusia ni* insect cells: effects of mammalian galactosyltransferase. *Glycobiology*, **10**, 837–847.
- Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glossl, J., and März, L. (1995) Insect cells contain an unusual, membrane-bound beta-N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17344–17349.
- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B.H., and März, L. (1999) Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj. J.*, **16**, 109–123.
- Boublik, Y., Di Bonito, P., and Jones, I.M. (1995) Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnology (NY)*, **10**, 1079–1084.
- Buscaglia, C.A., Campetella, O., Leguizamon, M.S., and Frasch, A.C. (1998) The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. *J. Infect. Dis.*, **177**, 431–436.
- Chaabihi, H., Ogliaistro, 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. *J. Virol.*, **67**, 2664–2671.
- 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.
- Ernst, W.J., Spenger, A., Toellner, L., Katinger, H., and Grabherr, R.M. (2000) Expanding baculovirus surface display. Modification of the native coat protein gp64 of *Autographa californica* NPV. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4033–4039.
- Felgner, P.L., and Ringold, G.M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, **337**, 387–388.
- Fraser, M.J. (1992) The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **158**, 131–172.
- Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimtz, M., Jager, V., and Conradt, H.S. (1993) Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glycoprotein variants from baculovirus-infected Sf21 cells. Characterization of polypeptides and posttranslational modifications. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 189–197.
- Grabherr, R., Ernst, W., Doblhoff-Dier, O., Sara, M., and Katinger, H. (1997) Expression of foreign proteins on the surface of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Biotechniques*, **22**, 730–735.
- Harduin-Lepers, A., Recchi, M.A., and Delannoy, P. (1995) 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology* **5**, 741–758.
- Hefferon, K.L., Oomens, A.G., Monsma, S.A., Finnerty, C.M., and Blissard, G.W. (1999) Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology*, **258**, 455–468.
- Hohmann, A.W., and Faulkner, P. (1983) Monoclonal antibodies to baculovirus structural proteins: determination of specificities by Western blot analysis. *Virology*, **125**, 432–444.
- Hollister, J.R., and Jarvis, D.L. (2001) Engineering lepidopteran insect cells for sialoglycoprotein expression by genetic transformation with mammalian β 1, 4-galactosyltransferase and α 2, 6-sialyltransferase genes. *Glycobiology*, **11**, 1–9.
- Hollister, J.R., Shaper, J.H., and Jarvis, D.L. (1998) Stable expression of mammalian beta 1, 4-galactosyltransferase extends the N-glycosylation pathway in insect cells. *Glycobiology*, **8**, 473–480.
- Hooker, A.D., Green, N.H., Baines, A.J., Bull, A.T., Jenkins, N., Strange, P.G., and James, D.C. (1999) Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN-gamma in Chinese hamster ovary and insect cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **63**, 559–572.
- Hsu, T.A., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Kato, K., Shimada, I., Masuda, K., Whiteley, E.M., Fan, J.Q., Lee, Y.C., and Betenbaugh, M.J. (1997) Differential N-glycan patterns of secreted and intracellular IgG produced in *Trichoplusia ni* cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9062–9070.
- Ito, Y., and Paulson, J.C. (1993) Combined use of *trans*-sialidase and sialyltransferase for enzymatic synthesis of α NeuAc2 \rightarrow 3 β Gal-OR. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7862–7863.
- Jarvis, D.L. (1997) Baculovirus expression vectors. In Miller, L.K., (eds), *The Baculoviruses*. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 389–431.
- Jarvis, D.L., and Finn, E.E. (1996) Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1288–1292.
- Jarvis, D.L., Fleming, J.G.W., Kovacs, G.R., Summers, M.D., and Guarino, L.E. (1990) Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *BioTechnology*, **8**, 950–955.
- Jarvis, D.L., Kawar, Z.S., and Hollister, J.R. (1998) Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**, 528–533.
- Karaçali, S., Kirmizigül, S., and Deveci, R. (1999) Sialic acids in developing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Invert. Reprod. and Develop.*, **35**, 225–229.
- Karaçali, S., Kirmizigül, S., Deveci, R., Deveci, O., Onat, T., and Gurcu, B. (1997) Presence of sialic acid in prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Tissue and Cell*, **29**, 315–321.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Leguizamon, M.S., Campetella, O.E., Gonzalez Cappa, S.M., and Frasch, A.C. (1994) Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of *trans*-sialidase that inhibit its activity. *Infect. Immun.*, **62**, 3441–3446.
- Loisel, T.P., Ansanay, H., St-Onge, S., Gay, B., Boulanger, P., Strosberg, A.D., Marullo, S., and Bouvier, M. (1997) Recovery of homogeneous and functional beta-2-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles. *Nat. Biotechnol.*, **15**, 1300–1304.
- Lopez, M., Coddeville, B., Langridge, J., Plancke, Y., Sautiere, P., Chaabihi, 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**, 635–651.
- Lopez, M., Tetaert, D., Juliant, S., Gazon, M., Cerutti, M., Verbert, A., and Delannoy, P. (1999) O-glycosylation potential of lepidopteran insect cell lines. *Biochim. Biophys. Acta*, **1427**, 49–61.
- Malykh, Y.N., Krisch, B., Gerardy-Schahn, R., Lapina, E.L., Shaw, L., and Schauer, R. (1999) The presence of N-acetylneuraminic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*. *Glycoconj. J.*, **16**, 731–739.
- Manneberg, M., Friedlein, A., Kurth, H., Lahm, H.W., and Fountoulakis, M. (1994) Structural analysis and localization of the carbohydrate moieties of a soluble human interferon gamma receptor produced in baculovirus-infected insect cells. *Prot. Sci.*, **3**, 30–38.
- Marchal, I., Mir, A.M., Kmiecik, D., Verbert, A., and Cacan, R. (1999) Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of N-glycans synthesized by insect cells: a metabolic study with Sf9 cell line. *Glycobiology*, **9**, 645–654.
- Marchal, I., Jarvis, D.L., Cacan, R., and Verbert, A. (2001) Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biol. Chem.*, **382**, 151–159.
- März, L., Altmann, F., Staudacher, E., and Kubelka, V. (1995) Protein glycosylation in insects. In Montreuil J., Schachter H. and Vliegenthart, J.F.G., eds., *Glycoproteins*. Elsevier, Amsterdam, pp. 543–563.
- Miller, L.K. (1988) Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**, 177–199.
- Monsma, S.A., and Blissard, G.W. (1995) Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. *J. Virol.*, **69**, 2583–2595.
- Ogonah, O.W., 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 glycoproteins. *BioTechnology*, **14**, 197–202.
- Oomens, A.G., and Blissard, G.W. (1999) Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*, **254**, 297–314.
- O'Reilly, D.R., and Miller, L.K. (1989) A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science*, **245**, 1110–1112.
- Pereira-Chioccola, V.L., and Schenkman, S. (1999) Biological role of *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase. *Biochem. Soc. Trans.*, **27**, 516–518.
- Quant-Russell, R.L., Pearson, M.N., Rohrmann, G.F., and Beaudreau, G.S. (1987) Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies. *Virology*, **160**, 9–19.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., and Gehring, W.J. (1992) Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **256**, 673–675.
- Rudd, P.M., Downing, A.K., Cadene, M., Harvey, D.J., Wormald, M.R., Weir, I., Dwek, R.A., Rifkin, D.B., and Gleizes, P.E. (2000) Hybrid and complex glycans are linked to the conserved N-glycosylation site of the third eight-cysteine domain of LTBP-1 in insect cells. *Biochemistry*, **39**, 1596–1603.
- Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M.E., and Nussenzweig, V. (1994) Structural and functional properties of *Trypanosoma trans*-sialidase. *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**, 499–523.
- Schenkman, S., Jiang, M.S., Hart, G.W., and Nussenzweig, V. (1991) A novel cell surface *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*, **65**, 1117–1125.
- Scudder, P., Doom, J.P., Chuenkova, M., Manger, I.D., and Pereira, M.E. (1993) Enzymatic characterization of beta-D-galactoside alpha 2, 3-*trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 9886–9891.
- Sugiyama, K., Ahorn, H., Maurer-Fogy, I., and Voss, T. (1993) Expression of human interferon-alpha 2 in Sf9 cells. Characterization of O-linked glycosylation and protein heterogeneities. *Eur. J. Biochem.*, **217**, 921–927.
- Summers, M.D., and Smith, G.E. (1987) A manual of methods for baculovirus and insect cell culture procedures. *Texas Agric. Exp. State Bull.*, **1555**, 1–5.
- 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.
- Tomlinson, S., Pontes de Carvalho, L., Vandekerckhove, F., and Nussenzweig, V. (1992) Resialylation of sialidase-treated sheep and human erythrocytes by *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase: restoration of complement resistance of desialylated sheep erythrocytes. *Glycobiology*, **2**, 549–551.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem N.J.R., and Heine, U. (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **645**, 63–70.
- Wagner, R., Geyer, H., Geyer, R., and Klenk, H.D. (1996a) N-acetyl-beta-glucosaminidase accounts for differences in glycosylation of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells from a baculovirus vector. *J. Virol.*, **70**, 4103–4109.
- Wagner, R., Liedtke, S., Kretzschmar, E., Geyer, H., Geyer, R., and Klenk, H.D. (1996b) Elongation of the N-glycans of fowl plague virus hemagglutinin expressed in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells by coexpression of human beta 1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase I. *Glycobiology*, **6**, 165–175.
- Whitford, M., Stewart, S., Kuzio, J., and Faulkner, P. (1989) Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **63**, 1393–1399.

2.2. Efficacité de la sialylation

Pour poursuivre ce travail, nous avons examiné l'efficacité de la resialylation constatée pour l'orosomucoïde (α 1-acid glycoprotein ou α 1-AGP) en présence de cellules infectées par le virus AcP10TS et de sialyl- α 2,3-lactose. En effet, seule la révélation avec la lectine MAA, spécifique des acides sialiques liés en α 2,3, permet de conclure à la resialylation. Bien que significatif, ce résultat n'est que qualitatif. Il est d'ailleurs à noter que nous n'avons jamais observé de reconnaissance de l'orosomucoïde natif par la MAA, bien qu'il présente des acides sialiques liés en α 2,3.

Nous avons donc étudié la composition en monosaccharides de l'orosomucoïde natif, désialylé ou resialylé, grâce à une méthode de chromatographie en phase gazeuse (Zanetta *et al.*, 1999) impliquant la dérivation en composés heptafluorobutyrylés après méthanolyse.

Dans ce but, le milieu d'incubation contenant l'orosomucoïde resialylé a été débarrassé des particules virales puis dialysé de façon extensive afin d'éliminer tous les composants micromoléculaires, en particulier les sucres du milieu de culture et surtout le sialyllactose donneur. La concentration de l'orosomucoïde étant de 1mg/mL, les autres protéines présentes dans le milieu ont été négligées.

La figure 28 montre le chromatogramme obtenu pour l'orosomucoïde resialylé. La composition en monosaccharides de l'orosomucoïde natif, désialylé et resialylé est présentée dans le tableau IV.

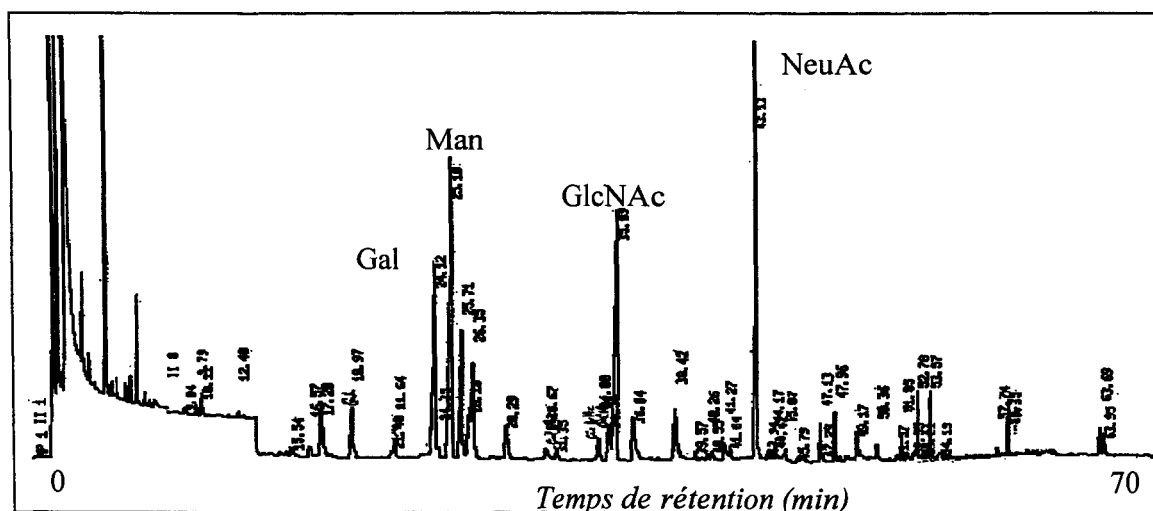


Figure 28 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides de l'orosomucoïde resialylé

Tableau IV : Composition en monosaccharides de l'orosomucoïde natif, désialylé ou resialylé*

orosomucoïde	Man	GlcNAc	Gal	NeuAc
natif	25,7%	24,2%	22,2%	27,8%
désialylé	33,1%	31,2%	31,3%	4,3%
resialylé	26,4%	25,1%	20,5%	27,9%

*Ces valeurs ne représentent pas la composition molaire mais des intensités de réponse.

Le niveau de sialylation de l'orosomucoïde en présence des cellules Sf9 exprimant la *trans*-sialidase atteint celui de la glycoprotéine native, suggérant que tous les résidus susceptibles d'être sialylés le sont. Ce résultat montre qu'une sialylation complète de glycoprotéines sécrétées et galactosylées peut être envisagée avec la *trans*-sialidase.

3. Discussion

Comme discuté dans l'introduction bibliographique, l'activité enzymatique de la *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* a été exploitée par plusieurs groupes pour synthétiser *in vitro* des oligosaccharides ou des glycoconjugués sialylés. Il nous a paru intéressant d'utiliser cette enzyme

in vivo pour répondre à un problème d'importance biotechnologique, la sialylation de glycoprotéines recombinantes dans le système baculovirus-cellules d'insectes.

Le but de cette étude était d'exprimer la *trans*-sialidase à la surface cellulaire, comme c'est le cas chez le parasite. Pour y parvenir, nous avons fusionné le domaine catalytique de la *trans*-sialidase à la séquence transmembranaire de la gp64 du baculovirus. L'enzyme recombinante a pu être détectée et caractérisée grâce à un anticorps polyclonal produit au laboratoire et grâce à la détection de son activité. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la localisation membranaire de l'enzyme. Néanmoins, une portion croissante au cours de l'infection de l'activité *trans*-sialidase est détectée dans le milieu d'infection.

Nous avons constaté que la *trans*-sialidase était aussi en partie associée aux particules virales. Ce résultat était prévisible puisque la gp64 joue un rôle prépondérant dans le bourgeonnement des virions. Cette propriété a d'ailleurs été exploitée pour exposer des antigènes spécifiquement à la surface des virions : c'est la technique de "viral display" (Boublik *et al.*, 1995, Grabherr *et al.*, 1997, Ernst *et al.*, 2000 et Grabherr *et al.*, 2001). Néanmoins, dans ce cas les glycoprotéines d'intérêt sont fusionnées à la gp64 entière afin d'assurer une intégration préférentielle dans l'enveloppe virale. Dans notre étude, le fragment de la gp64 est limité à 30 acides aminés, de sorte que les fonctions portées par les domaines extracellulaires de la gp64 ne sont pas conservées.

Il est plus surprenant de constater qu'une très grande part de l'activité est soluble. Alors que l'activité cellulaire totale, tout comme l'activité membranaire, atteint un maximum vers 48h p.i., l'activité soluble augmente tout au long de l'infection. Cette *trans*-sialidase soluble ne semble pas résulter d'un clivage protéolytique. Elle n'est pas non plus sédimentable ni retenue sur filtre. Par conséquent, il ne peut s'agir de vésicules résultant d'une exfoliation de la membrane (Trams *et al.*, 1981). L'analyse par électrophorèse en conditions natives suggère plutôt l'existence d'agrégats de haut poids moléculaire. Il est en effet concevable que la *trans*-sialidase, surexprimée sous le contrôle du promoteur *p10*, soit correctement intégrée dans la membrane en début d'infection, puis établisse des liaisons hydrophobes permettant la formation d'agrégats stables lorsque l'intégration membranaire ne peut plus se faire correctement. Il serait donc intéressant d'exprimer la même construction sous le contrôle d'un promoteur moins fort.

En dépit de cette mauvaise intégration membranaire, signalons que la totalité de la *trans*-sialidase semble *N*-glycosylée, ce qui traduit l'efficacité de la reconnaissance du peptide signal, de la translocation vers le RE et du transfert des glycanes. Par contre, nous n'avons pas examiné si les deux sites de *N*-glycosylation étaient occupés.

Le résultat essentiel de cette étude est que la construction permet l'expression d'une *trans*-sialidase active et capable de catalyser une sialylation quantitative. Dans la première expérience utilisant la fêtuine comme donneur et du lactose comme accepteur, nous avons estimé que le rapport entre les résidus d'acides sialiques susceptibles d'être transférés et les résidus de galactose accepteur était à peu près stoechiométrique. La sialylation d'un tiers du lactose en 24h peut donc être considérée comme un très bon résultat. De même, nous avons pu resialyler totalement l'orosomucoïde en utilisant cette fois un excès de donneur. En outre, la concentration de l'orosomucoïde (1mg/mL) dans nos conditions est largement supérieure aux concentrations généralement atteintes de protéines recombinantes produites dans le système baculovirus.

Au moment de cette étude, nous ne disposions pas de cellules modifiées capables de produire des glycoprotéines galactosylées, c'est pourquoi nous avons utilisé des substrats exogènes. On peut néanmoins prévoir que le système sera également efficace sur des glycoprotéines produites par les cellules.

Le système reste donc à optimiser, d'abord par la régulation de l'expression de la *trans*-sialidase, et par la définition des meilleures conditions permettant une bonne sialylation des glycoprotéines galactosylées et sécrétées. Notamment, il faudra choisir le donneur d'acides sialiques et la quantité nécessaire selon la glycoprotéine d'intérêt.

*Conclusions et
perspectives*

Conclusions et perspectives

Grâce à des vecteurs d'expression basés sur le baculovirus, les cellules d'insectes sont de plus en plus utilisées pour la production de protéines recombinantes. Leur succès s'explique notamment par les hauts niveaux d'expression qui peuvent être atteints et la possibilité de sélectionner facilement les recombinants. Dans le cas de protéines thérapeutiques, le système offre aussi une certaine sécurité puisqu'aucun virus pathogène pour l'homme ne peut se multiplier dans les cellules de Lépidoptères. Aucun prion n'est pour l'instant connu chez les insectes. Le système baculovirus-cellules d'insectes est par conséquent une alternative potentielle aux cellules de mammifères, dont la culture est plus délicate et plus coûteuse.

Cependant, l'étude des capacités des cellules d'insectes concernant la maturation et la sécrétion des protéines, encouragée par l'essor du système baculovirus, a révélé des propriétés spécifiques, en particulier pour la glycosylation. Dans leur majorité, les structures *N*-glycanniques rencontrées sur les protéines endogènes ou recombinantes sont en effet des espèces oligomannosidiques ($\text{Man}_{6-9}\text{GlcNAc}_2$) ou tronquées ($\text{Man}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$), mais pas de type complexe. Les principaux *O*-glycannes sont de type GalNAc ou Gal β 1,3GalNAc. Ces oligosaccharides peuvent compromettre l'efficacité d'une glycoprotéine thérapeutique ou la rendre antigénique.

Les techniques de génie génétique permettent néanmoins d'envisager l'ingénierie des propriétés de glycosylation des cellules d'insectes, pour les rendre aptes à produire des protéines glycosylées conformément à des protéines humaines. Notre travail s'inscrit dans cet effort global d'"humanisation" de la glycosylation dans le système baculovirus-cellules d'insectes et a impliqué une collaboration entre l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université de Lille I (UMR 8576 du CNRS) et la Station de Pathologie comparée de Saint-Christol lez Alès (UMR 5087 INRA / CNRS / Université de Montpellier II).

Notre première préoccupation a été de comprendre comment la voie de maturation aboutit chez les insectes à des *N*-glycannes de type $\text{Man}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$. La séquence des événements a été examinée à l'aide de marquages métaboliques des *N*-glycannes. Nous avons choisi de travailler sur la lignée Sf9 qui est la plus largement utilisée et la mieux connue, et nous nous sommes focalisés sur des cellules non infectées. Ultérieurement, des marquages métaboliques de cellules infectées n'ont montré aucune différence qualitative.

Les premiers résultats ont révélé une très grande homogénéité des espèces complètement maturées, puisqu'il s'agit essentiellement de $\text{Man}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$, largement fucosylé. Les intermédiaires typiques du reticulum endoplasmique ($\text{Glc}_{0-1}\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}_2$) ont un profil similaire à celui retrouvé pour des cellules de mammifères. Par contre, aucun intermédiaire n'est détecté entre ces espèces longues et l'espèce finale.

C'est donc pour identifier des intermédiaires que nous avons eu recours à deux inhibiteurs de la maturation (la castanospermine et la swainsonine) et à un inhibiteur du trafic golgien, la monensine. L'utilisation de la swainsonine puis de la monensine nous ont permis d'observer deux intermédiaires portant un résidu de GlcNAc terminal, de structures respectives $\text{GlcNAcMan}_5[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$ et $\text{GlcNAcMan}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$. Ce résultat est conforme au schéma selon lequel, comme chez les mammifères, l'action d'une *N*-acétylglucosaminyltransférase I précède celle de la mannosidase II et de l' α 1,6-fucosyltransférase. L'espèce $\text{GlcNAcMan}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$ ainsi produite et détectable seulement en présence de monensine est ensuite le substrat d'une β -*N*-acétylglucosaminidase qui avait été mise en évidence par plusieurs études (Altmann *et al.*, 1995 et Wagner *et al.*, 1996a). Nos résultats permettent donc de confirmer le chemin métabolique suivi lors de la maturation des *N*-glycannes dans les cellules d'insectes et suggèrent de plus une localisation de la glucosaminidase dans un compartiment très tardif de la voie de sécrétion.

Sur ces bases, la modification du potentiel de glycosylation par addition de nouvelles glycosyltransférases peut être envisagée. Ainsi, les travaux du laboratoire de D. Jarvis montrent que l'addition d'une β 1,4-galactosyltransférase dans des cellules transfectées permet l'obtention de glycoprotéines portant du galactose terminal (Hollister *et al.*, 1998). Les marquages métaboliques que nous avons effectués dans le cadre d'une collaboration avec ce laboratoire montrent qu'en présence de la galactosyltransférase, les deux espèces majoritairement synthétisées sont de formules $\text{Man}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$ et $\text{GalGlcNAcMan}_3[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$. L'expression de la galactosyltransférase, sous le contrôle d'un promoteur viral, est augmentée lors de l'infection par un baculovirus. Dans ce cas, seule l'espèce galactosylée est observée. Ces résultats montrent que le flux métabolique peut être partiellement à totalement dévié vers la synthèse d'oligosaccharides de type complexe grâce à l'expression d'une β 1,4-galactosyltransférase, sans que la glucosaminidase ne soit inactivée.

Néanmoins, les structures restent monoantennées, l'obtention de glycanes à deux antennes ou plus demandera l'addition des *N*-acétylglucosaminyltransférases correspondantes. De plus, les structures produites dans ce contexte ne sont pas non plus sialylées. Cette observation est cohérente avec l'absence d'activités sialyltransférases (Butters *et al.*, 1981 ; Hooker *et al.*, 1999 et Lopez *et al.*, 1999) et de CMP-Neu5Ac (Hooker *et al.*, 1999). En dépit des contradictions qui existent à ce sujet, ces données confirment que les cellules de Lépidoptères en culture ne sont pas capables de produire des glycoprotéines sialylées, même lorsque l'accepteur galactosylé est présent.

Ces constatations nous ont amenés à l'autre volet de notre travail, qui a consisté à évaluer un nouvel outil pour permettre la sialylation des glycoprotéines dans le système baculovirus-cellules d'insectes : la *trans*-sialidase. La stratégie mise en œuvre mime celle du parasite *Trypanosoma cruzi*, incapable de synthétiser lui-même les acides sialiques nécessaires à l'invasion des cellules hôtes. Une *trans*-sialidase présente à la surface du parasite permet en effet la sialylation de ses antigènes membranaires aux dépens de glycoconjugués de l'hôte.

Pour reproduire ce système dans les cellules d'insectes, nous avons réalisé une construction moléculaire constituée du domaine catalytique de la *trans*-sialidase de *T. cruzi* et du domaine transmembranaire de la glycoprotéine majeure d'enveloppe du baculovirus. La protéine chimérique a, dans une première approche, été exprimée dans un vecteur baculovirus sous le contrôle du promoteur *p10*. Son expression a été étudiée grâce à des tests d'activité et à un anticorps polyclonal produit au laboratoire. Nous avons ainsi observé que l'enzyme était localisée à la surface des cellules infectées et des particules virales isolées, mais aussi dans le milieu extracellulaire, où elle devient majoritaire en fin d'infection. Cette surprenante constatation nous a conduits à rechercher comment l'enzyme était solubilisée. Il est apparu qu'elle ne résultait pas d'un clivage protéolytique ni d'une exfoliation de vésicules, mais plus probablement d'une formation d'agrégats supramoléculaires solubles, vraisemblablement due à la surexpression.

Néanmoins, nous avons également observé, à l'aide de substrats exogènes galactosylés (lactose et asialo-orosomucoïde), que les cellules Sf9 exprimant la *trans*-sialidase pouvaient catalyser une sialylation quantitative en présence d'un donneur adéquat.

Ces résultats préliminaires demandent à être optimisés, d'abord en diminuant l'expression de la *trans*-sialidase grâce à un promoteur modéré. Dans l'optique de produire et purifier des

glycoprotéines recombinantes, il sera en effet important que la *trans*-sialidase ne soit pas libérée dans le milieu extracellulaire. La construction elle-même pourra être modifiée si nécessaire. D'autre part, la détermination des meilleurs donneurs et surtout des quantités nécessaires permettra d'optimiser le rendement de sialylation et les coûts. Enfin, l'efficacité de sialylation d'une glycoprotéine modèle sécrétée pourra être évaluée plus précisément dans le cadre de la coexpression d'une β 1,4-galactosyltransférase avec la *trans*-sialidase.

La principale limite de la *trans*-sialidase est de ne réaliser que des liaisons α 2,3. L'enzyme est donc inutilisable dans les cas où une liaison α 2,6 est absolument requise. En revanche, elle a l'avantage de pouvoir sialyler efficacement des oligosaccharides *N*- et *O*-liés.

Parallèlement à ce travail, Hollister et Jarvis (2001) ont obtenu une lignée de cellules transfectées exprimant de façon constitutive la β 1,4-galactosyltransférase et une α 2,6-sialyltransférase et observent que des glycoprotéines produites dans ces cellules sont sialylées. Toutefois, la sialylation ne se fait que lorsque des glycoprotéines sialylées sont présentes dans le milieu. Les auteurs suggèrent donc que les cellules d'insectes sont capables de réutiliser l'acide sialique du milieu et de le transformer en CMP-Neu5Ac. D'après ce résultat, l'addition des gènes de sialyltransférases semble donc suffisante, à condition que le milieu contienne une source d'acides sialiques.

Néanmoins, la *trans*-sialidase reste un outil intéressant grâce à sa large spécificité : elle peut assurer la sialylation de structures très différentes alors que plusieurs sialyltransférases seraient nécessaires.

L'ensemble de ces résultats montre que le système baculovirus-cellules d'insectes se prête particulièrement bien à l'ingénierie de la glycosylation par simple addition de glycosyltransférases. Le problème encore délicat de la sialylation peut être résolu grâce à une *trans*-sialidase membranaire. L'obtention de glycoprotéines correctement glycosylées est par conséquent envisageable à moyen terme.

Sur le plan fondamental, la signification des structures tronquées typiques des cellules d'insectes reste un mystère. Plusieurs études ont établi sans équivoque l'existence de composés sialylés chez des embryons ou des larves de divers insectes (Roth *et al.*, 1992, Karaçali *et al.*,

1997, 1999 et 2000 et Malykh *et al.*, 1999), mais pas chez des adultes ou sur des cellules en culture. Ces observations supposent que les gènes nécessaires à la synthèse de *N*- ou *O*-glycannes sialylés sont présents et actifs dans les stades précoces de développement, puis réprimés par la suite. Des structures sialylées pourraient ainsi avoir un rôle essentiel au cours du développement, comme chez les Vertébrés.

Une nouvelle voie de recherche s'ouvre donc avec l'identification et l'étude des gènes de glycosyltransférases d'insectes et de leurs mécanismes de régulation. A ce titre, l'identification chez la drosophile d'un ADNc similaire à une séquence d' α 2,6-sialyltransférase est un résultat encourageant (numéro d'accès GenBank : AF218237). Des expériences d'interruption de gènes, notamment chez la drosophile où cette technique est désormais maîtrisée, pourraient apporter des informations sur la fonction des glycoconjugués sialylés au cours du développement.

Appendice technique

Dans cette section sont détaillées les procédures expérimentales qui ne sont pas ou pas complètement décrites dans les articles.

I. Cellules et virus

1. Cellules

Les cellules Sf9 issues de *Spodoptera frugiperda* (ATCC CRL 1711) sont cultivées à 28°C dans le milieu EXTRA 1X™ (Eurobio, Les Ulis, France) contenant 5% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco BRL Life Technologies, France), et des antibiotiques : pénicilline (3,5mM) et streptomycine (35µM) (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) ou dans un milieu sans sérum, EXTRA SB5™ (Eurobio), contenant du cholestérol (4mg/L, Sigma) et des antibiotiques.

Les cellules Sfβ4GalT nous ont été gracieusement fournies par J. Hollister (Université du Wyoming). Elles sont cultivées dans le milieu TNM-FH (Sigma) contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 1% de complément lipidique Pluronic F-68™ (Sigma) et des antibiotiques.

Les cellules Ea4 issues d'*Estigmene acrea* (ECACC 96073116, Novagen) sont cultivées dans les mêmes conditions que les Sfβ4GalT.

2. Virus

Deux virus ont été utilisés :

Le virus AcSLP10 produit par H. Chaabihi (Chaabihi *et al.*, 1993) dérive du baculovirus sauvage AcMNPV par délétion du locus polyédrine et réinsertion de la séquence codant la polyédrine dans le locus du gène *p10*. Il possède ainsi un phénotype avec formation de polyèdres. Les virus recombinants produits par l'insertion de séquences étrangères dans le locus *p10* possèdent un phénotype sans polyèdres et peuvent donc être facilement distingués par la technique des plages de lyse (Summers et Smith, 1987).

Le virus recombinant AcP10TS a été produit comme détaillé dans l'article II par insertion de la construction codant la *trans*-sialidase dans le locus *p10*. Il possède un phénotype sans polyèdres.

Les deux virus ont été amplifiés dans des cellules Sf9 et les stocks viraux, titrés par la méthode des plages de lyse, ont été stockés à 4°C. Les titres viraux obtenus pour les deux virus sont comparables.

Les infections ont été effectuées à des multiplicités d'infection (MOI) de 5 pfu (plaque forming unit) par cellule.

II. Marquages métaboliques et analyse des oligosaccharides

1. Marquages métaboliques

1.1. Le milieu de marquage

Il s'agit d'un milieu synthétique, formulé d'après le milieu de Grace (Grace, 1962) mais dépourvu de sucres et de sérum. Avant le marquage, le milieu est retiré, les cellules sont lavées par le milieu de marquage puis préincubées pendant 30 minutes dans ce milieu.

1.2. Marquage métabolique au 2-[³H]Man

Les cellules sont incubées dans un volume minimal (2mL pour un flacon de 25cm²) de milieu synthétique contenant 100µCi de 2-[³H]Man (Amersham, Royaume Uni, radioactivité spécifique : 429GBq/mmol), à 28°C. Après 2h d'incubation, les cellules sont lavées à 0°C par du PBS de pH 6,5 avant de subir l'extraction séquentielle.

2. Préparation des oligosaccharides

2.1. Lyse des cellules en vue de l'extraction

Après le marquage, les cellules sont remises en suspension dans 0,35mL de mélange d'arrêt (IgG 10%, MgCl₂ 5mM, cacodylate de sodium 0,1M, pH 7,4) puis transférées dans le tube d'extraction avec 0,8mL de méthanol et 1,2mL de chloroforme.

2.2. Extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques

Elle est fondée sur les différences de solubilité des produits marqués au 2-[³H]Man et générés par le cycle des dolichols. Le mélange chloroforme/méthanol/eau (3/2/1, v/v/v) donne naissance, après centrifugation, à trois phases majeures :

- la phase inférieure (CM pour chloroforme/méthanol) contient les composés les moins polaires ;

- la phase supérieure, aqueuse, contient les molécules les plus polaires : monosaccharides libres, nucléotides-sucres et oligosaccharides libres ;
- l'interphase contient les glycoprotéines dénaturées mais aussi les intermédiaires amphipolaires du cycle des dolichols, les oligosaccharides liés au pyrophosphodolichol. Ces derniers seront séparés des glycoprotéines par des extractions supplémentaires dans un mélange chloroforme/méthanol/eau (CMW, 10/10/3, v/v/v).

L'extraction séquentielle d'après Cacan et Verbert (1995) est illustrée dans la figure 29.

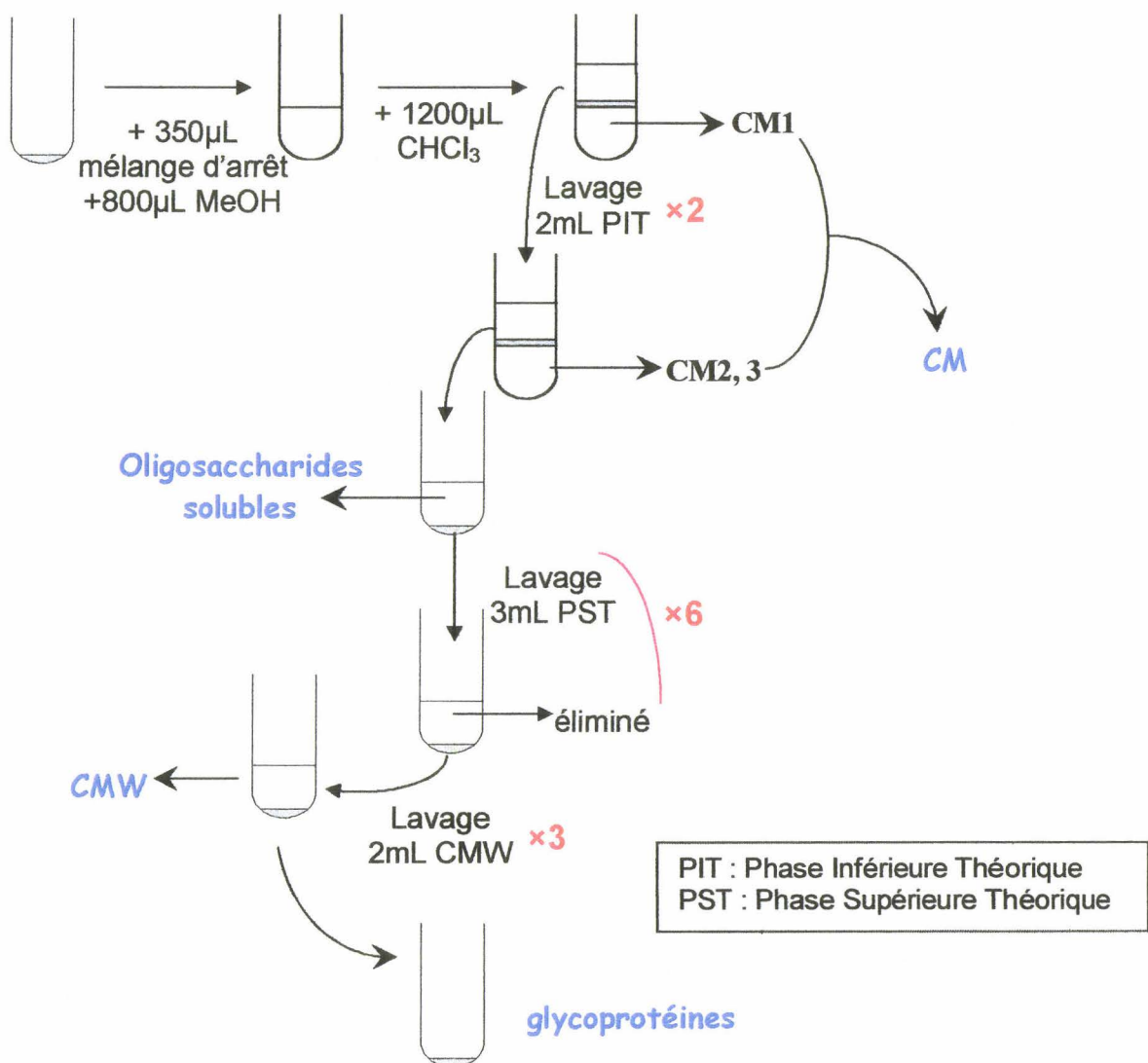


Figure 29 : Extractions séquentielles des intermédiaires du cycle des dolichols, d'après Cacan et Verbert, 1995.

Les solutions utilisées ont les compositions suivantes :

☆ PIT : chloroforme/méthanol/MgCl₂ 4mM : 86/14/1, v/v/v.

☆ PST : chloroforme/méthanol/MgCl₂ 4mM : 3/48/47, v/v/v.

☆ CMW : chloroforme/méthanol/eau : 10/10/3, v/v/v.

2.3. Préparation d'oligosaccharides à partir des glycoprotéines

Le culot protéique obtenu après l'extraction séquentielle est digéré par 300µg de trypsine bovine (Sigma) dans 0,3mL de tampon bicarbonate de sodium 100mM pH 7,9 à température ambiante pendant une nuit. La trypsine est inactivée par une ébullition de 10 minutes.

L'hydrolysats trypsique est séché puis redissout dans 0,1mL de tampon phosphate de sodium 20mM pH 7,5, EDTA 50mM dans lequel sont ajoutés 500mU de PNGaseF (Boehringer Mannheim, Allemagne). Après une nuit à 37°C, les oligosaccharides sont purifiés sur une colonne de Biogel P2.

3. *Analyse des oligosaccharides*

3.1. Analyse par HPLC

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est réalisée sur une colonne de type amino Asahipak NH₂P50, de dimensions 250 × 4,6mm (Asahi, Kawasaki-Ku, Japon). Les oligosaccharides sont élués en fonction de leur taille par un gradient continu acétonitrile/eau de 70/30 à 50/50 (v/v). Les espèces radioactives sont détectées en continu par un détecteur β Flo-One (Packard, France) en scintillation liquide dans le Flow 302 (Quickszink Flow, Allemagne). Avant l'injection, l'échantillon sec est repris dans du mélange acétonitrile/eau 70/30, (v/v) et filtré.

3.2. HPLC préparative

Les espèces sont séparées selon le même principe et des fractions de 1mL sont récupérées. Un aliquot de chaque fraction est compté en scintillation liquide afin de repérer les pics.

3.3. Digestions par des exoglycosidases spécifiques

Pour l'analyse des glycannes des cellules S β 4GalT, les enzymes (Glyko, Oxford, Royaume Uni) ont été utilisées dans les conditions suivantes :

enzyme	<i>N</i> -acétyl- β -hexosaminidase	β -galactosidase
source	<i>Canavalia ensiformis</i> (jack bean)	
tampon d'incubation	Citrate/phosphate de sodium 100mM pH 5,0	Citrate de sodium 50mM pH 3,5
quantité d'enzyme utilisée	100mU	100mU
conditions de digestion	2h à 37°C, dans 100 μ L	6h à 37°C, dans 100 μ L

Après l'incubation, l'enzyme est précipitée par addition d'éthanol froid et éliminée sur filtre de 0,45 μ m de porosité. L'échantillon est repris dans l'acétonitrile/eau 70/30 puis injecté en HPLC.

III. Cytofluorimétrie de flux

Les cellules Sf9, Sf β 4GalT et Ea4, prises en phase exponentielle de croissance (0,5 à 1 \times 10⁶ cellules par expérience), ont été lavées trois fois dans un tampon Tris-HCl 50mM pH 7, NaCl 100mM, CaCl₂ 1mM, MnCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM, et 0,01% NaN₃ dans la glace. Elles ont ensuite été incubées 1h dans ce tampon en présence de 1 μ g/mL de RCA₁₂₀-FITC (Isothiocyanate de fluorescéine) (Sigma) et de 5mg/mL de sérumalbumine bovine (Sigma). Les cellules ont été analysées sur un système FACScalibur™ (Beckton Dickinson, Sunnyvale, USA). La fixation non spécifique a été mesurée en ajoutant au milieu d'incubation 100mM de lactose.

IV. Analyse de la composition en monosaccharides de l'orosomucoïde

1. Préparation des échantillons

1.1. Orosomucoïde désialylé

L'orosomucoïde bovin natif (Sigma) a été désialylé par un traitement de 3h à l'acide acétique 3M à 80°C. Après plusieurs jours de dialyse contre de l'eau à 4°C, le produit a été lyophilisé puis stocké à -20°C. La désialylation a été contrôlée par chromatographie en phase gazeuse comme décrit ci-après.

1.2. Orosomucoïde resialylé

Les cellules Sf9 cultivées en milieu sans sérum EXTRA SB5 ont été infectées par le virus AcSLP10 ou par le virus AcP10TS comme décrit dans l'article II. Après 24h d'infection, le milieu

a été remplacé par du milieu frais contenant 1mM de sialyl- α 2,3-lactose et 1mg/mL d'orosomucoïde désialylé. Après 60h d'incubation, le milieu a été récupéré et débarrassé des particules virales par ultracentrifugation 20min à 50000 \times g à 4°C, puis dialysé contre de l'eau à 4°C et sous agitation pendant une semaine en changeant le bain tous les jours. L'échantillon a ensuite été lyophilisé et analysé par chromatographie en phase gazeuse.

2. Méthanolyse et dérivation

La méthode mise au point par Zanetta *et al.* (1999) implique la formation de dérivés heptafluorobutyrate des O-méthyl-glycosides libérés par méthanolyse des glycoprotéines.

2.1. Méthanolyse

Les échantillons sont lyophilisés dans des tubes en pyrex en présence ou non de lysine (2 μ g) comme standard interne. Le réactif de méthanolyse (HCl 0,5M dans du méthanol anhydre, 0,5mL) est ajouté puis le tube bouché est placé pendant 20h à 80°C.

2.2. Acylation

Après la méthanolyse, les échantillons sont séchés sous un flux d'azote puis traités pendant 15min à 160°C par 25 μ L d'anhydride heptafluorobutyrique dans 200 μ L d'acétonitrile anhydre. Après refroidissement, ils sont séchés sous flux d'azote afin d'éliminer l'excédent de réactif.

3. Chromatographie en phase gazeuse

Les échantillons sont repris dans un volume approprié d'acétonitrile anhydre, puis un aliquot (1 ou 2 μ L) est introduit dans l'injecteur. Les analyses ont été réalisées sur un chromatographe Shimadzu GC-14A équipé d'un injecteur Ross et d'une colonne capillaire de 25m de longueur (25QC3/BP1 ; phase liquide en film de 0,5 μ m ; SGE France SARL ; Villeneuve Saint-Georges, France). La température de l'injecteur et du détecteur par ionisation de flamme sont de 260°C. La chromatographie est effectuée selon le programme suivant : deux gradients successifs de température à 1,2°C/min de 100°C à 140°C, puis à 4°C/min de 140°C à 240°C puis 10min à 240°C. La pression du gaz (hélium) est de 0,8bar.

Annexe

Au cours de ces travaux, nous avons écrit une revue générale pour faire le point sur l'existence ou non d'acides sialiques chez les insectes. Cette revue a été publiée dans *Biological Chemistry*.

Revue :

Marchal, I., Jarvis, D.L., Cacan, R. and Verbert, A. (2001)

Glycoproteins from insect cells: sialylated or not?

Biol Chem **382**(2), 151-9.

Review

Glycoproteins from Insect Cells: Sialylated or Not?

Ingrid Marchal¹, Donald L. Jarvis², René Cacan^{1,*} and André Verbert^{1,a}

¹ Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS UMR n°8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

² Department of Molecular Biology, University of Wyoming, Laramie, Wyoming 82071-3944, USA

* Corresponding author

Our growing comprehension of the biological roles of glycan moieties has created a clear need for expression systems that can produce mammalian-type glycoproteins. In turn, this has intensified interest in understanding the protein glycosylation pathways of the heterologous hosts that are commonly used for recombinant glycoprotein expression. Among these, insect cells are the most widely used and, particularly in their role as hosts for baculovirus expression vectors, provide a powerful tool for biotechnology. Various studies of the glycosylation patterns of endogenous and recombinant glycoproteins produced by insect cells have revealed a large variety of O- and N-linked glycan structures and have established that the major processed O- and N-glycan species found on these glycoproteins are (Gal β 1,3)GalNAc-O-Ser/Thr and Man3(Fuc)GlcNAc2-N-Asn, respectively. However, the ability or inability of insect cells to synthesize and compartmentalize sialic acids and to produce sialylated glycans remains controversial. This is an important issue because terminal sialic acid residues play diverse biological roles in many glycoconjugates. While most work indicates that insect cell-derived glycoproteins are not sialylated, some well-controlled studies suggest that sialylation can occur. In evaluating this work, it is important to recognize that oligosaccharide structural determination is tedious work, due to the infinite diversity of this class of compounds. Furthermore, there is no universal method of glycan analysis; rather, various strategies and techniques can be used, which provide glycobiochemists with relatively more or less precise and reliable results. Therefore, it is important to consider the methodology used to assess glycan structures

when evaluating these studies. The purpose of this review is to survey the studies that have contributed to our current view of glycoprotein sialylation in insect cell systems, according to the methods used. Possible reasons for the disagreement on this topic in the literature, which include the diverse origins of biological material and experimental artifacts, will be discussed. In the final analysis, it appears that if insect cells have the genetic potential to perform sialylation of glycoproteins, this is a highly specialized function that probably occurs rarely. Thus, the production of sialylated recombinant glycoproteins in the baculovirus-insect cell system will require metabolic engineering efforts to extend the native protein glycosylation pathways of insect cells.

Key words: Baculovirus/Glycoproteins/Insect cells/Recombinant glycoproteins/Sialylation.

Introduction

Considering the rapid progress in sequencing the genomes of many organisms, including humans, the availability of expression systems that can be used to produce authentic mammalian proteins and glycoproteins has become crucial. One of the most important features of such a system is its glycosylation potential. Indeed, in order to study the biological properties of a recombinant glycoprotein or use it as a therapeutic agent, its glycosylation pattern must closely resemble the *in vivo* glycosylation pattern of the native product. Insect cells are widely used to produce recombinant proteins, as they can synthesize large quantities of a protein of interest when infected with powerful baculovirus-based gene expression vectors, and they can provide post-translational modifications similar to those provided by mammalian cells. Studies have shown that glycoproteins produced by all insect systems studied to date have O- and N-glycans with core structures similar or identical to those produced by all eukaryotes. In contrast, most studies suggest that insect cell-derived glycoproteins typically fail to acquire antennae of the N-acetylglucosaminyl type or peripheral sugars, especially sialic acids, which are commonly found on native mammalian glycans. Sialic acids play extremely important roles in glycoprotein biology. Because they are typically found as terminal residues on cell-surface glycoconjugates or circulatory components, they are involved in many cell-cell interactions, immunological reactions and in the clearance of circulating glycoproteins. Accordingly, the pres-

^a André Verbert died on 20 May 2000. We will miss his friendship and his enthusiasm. This review is dedicated to his memory.

ence or absence of sialic acids in insect cells is a significant and somewhat controversial issue regarding the use of these cells as recombinant glycoprotein factories.

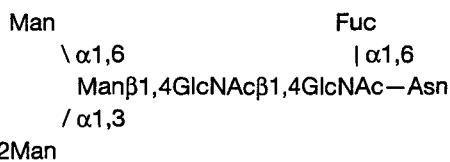
In addition to its biotechnological significance, the presence or absence of sialic acids in insects is fundamentally interesting from a phylogenetic point of view. According to an early review (Warren, 1963), sialic acids had not been detected among the Coelenterata, Annelida or Sipunculoidea. In contrast, they had been found in all vertebrate species, cephalocords, and echinoderms and were found sporadically among some platyhelminths, molluscs, and arthropods. In some phyla, KDN (keto-deoxyneuraminic acid) was found in place of sialic acid. Among the arthropods, lobsters reportedly had sialic acids but, at that time, no sialic acids had been detected in any insect or arachnid species examined.

In this review, we will survey the studies that have contributed to our current view of the presence or absence of sialic acids in endogenous, viral and recombinant glycoproteins synthesized by insect cells, taking into account the methods used to determine glycan structures.

Current Knowledge of Insect Cell Protein Glycosylation

There is evidence that many of the glycoprotein processing events known to occur in mammalian cells also occur in insect cells. For a general review, see März *et al.* (1995).

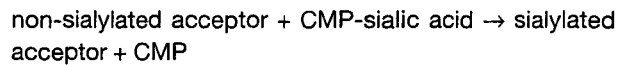
The insect N-glycosylation pathway parallels the mammalian pathway up until formation of the following structure:



The major insect cell processing pathway downstream of this intermediate involves removal of the GlcNAc residue by a Golgi-associated N-acetylglucosaminidase, which produces a paucimannose type N-glycan (Altmann *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1996a; Marchal *et al.*, 1999). This end-product is the most highly processed glycan found on most insect cell-derived N-linked glycoproteins. However, this does not appear to be the only N-glycan processing pathway found in insect cells, as various reports indicate that these cells also can produce subpopulations of some glycoproteins containing terminal N-acetylglucosaminyl, galactosyl, and sialyl residues. The O-glycosylation pathway in many lepidopteran insect cell lines produces glycoproteins containing GalNAc α -O-Ser/Thr and a subpopulation of these structures is further processed to produce the Gal β 1,3GalNAc α -O-Ser/Thr core-1 structure (März *et al.*, 1995). Both of these O-glycans are potential acceptors for sialyl residues.

Requirements for Glycoprotein Sialylation

The occurrence of sialic acid in a glycoconjugate from a particular cell type implies that that cell can perform the following reaction:



where CMP is cytidine monophosphate.

Thus, the requirements for sialylation of a glycoconjugate are:

The acceptor: acceptors include N-glycoproteins, O-glycoproteins, and glycolipids, and the sialyl residue can be transferred to galactosyl, N-acetylgalactosaminyl or sialyl residues.

The enzyme: the sialyltransferases are a large family of enzymes, which all use CMP-Neu5Ac (CMP-N-acetylneuraminic acid) or its derivatives *e. g.* CMP-Neu5Gc (CMP-N-glycolylneuraminic acid) as a donor. These enzymes have high specificity toward the acceptor and generally recognize not only the monosaccharide to which the sialic acid is transferred, but a more complex glycan motif. For a review, see Harduin-Lepers *et al.* (1995).

The donor substrate: the sialylation reaction requires the activated form of sialic acid, CMP-Neu5Ac, or its derivatives, as mentioned above. The CMP-NeuAc synthase, in contrast to other sugar-nucleotide synthases, is a nuclear resident as shown by biochemical studies (for a review see Kean, 1991) and, more recently, *via* expression of the cloned murine cDNA (Münster *et al.*, 1998).

Proper subcellular localization of both enzyme and substrates: sialylation reactions occur in the *trans*-Golgi. Translocation of donor substrates into the lumen of the Golgi apparatus requires a specific CMP-Neu5Ac/CMP antiporter, which is well characterized in mammals (Eckhardt *et al.*, 1996; Hirschberg *et al.*, 1998).

How to Assess the Sialylation Ability of a Cell

One way to assess the ability of a tissue to sialylate glycoproteins is to measure sialyltransferase activity in that tissue using either endogenous or exogenous acceptors. These assays can be performed by incubating cell extracts, subcellular fractions, or tissue slices with radiolabeled CMP-Neu5Ac. A similar approach is metabolic labeling with radioactive mannosamine or Neu5Ac, although the way by which the latter, anionic precursor, is taken up by cells is not understood.

A totally different approach is to analyze endogenous or recombinant glycoproteins for the presence of sialyl residues. Some methods utilize neuraminidases, which can specifically remove sialic acids, whereas other methods utilize lectins, which can specifically bind sialic acids. Among the lectins, MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) and SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) are commonly used to detect α 2,3 and α 2,6 sialic acids, respectively. The use of neuraminidase must be coupled with a subse-

quent analysis of the biological or biophysical properties of the putatively sialylated molecule; for example, one might compare the electrophoretic mobilities of a glycoprotein before and after neuraminidase treatment. Lectins can be used to stain sialylated glycoproteins after electrophoresis and transfer to a membrane or they can be used for agglutination assays. Lectin-based assays must always be coupled with extensive controls, including endoglycosidase treatments, neuraminidase treatments, and/or the use of competing monosaccharides, to verify the carbohydrate specificity of the lectin binding results. More direct physico-chemical methods also can be used to detect sialic acids. While early work involved histochemical and colorimetric methods, more recent studies have involved the separation of glycan moieties by HPLC (high performance liquid chromatography), HPAEC (high pH anion exchange chromatography), or FACE (fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis), followed by structural determinations using mass spectrometry or NMR (nuclear magnetic resonance).

One factor that can complicate the measurement of sialyltransferase activities or sialic acids is degradation by sialidases, which have been detected in insect cells (Licari *et al.*, 1993), and could lead to false-negative results. The opposite problem is contamination with sialic acids or sialoglycoproteins derived from the animal serum used in the cell growth medium, which can produce false-positive results.

Sialylation of Endogenous Insect Cell Glycoproteins

Endogenous glycoproteins are defined as those that are encoded by the cellular genome, thus excluding any glycoprotein expressed during viral infection, including recombinant glycoproteins.

Detection of Sialyl Residues

In early studies, Vadgama and Kamat (1969) and Kamat (1971) used alcian blue staining, combined with mild acid hydrolysis and neuraminidase digestion to show the presence of sialic acids in the salivary glands of insects from several different orders. These conclusions were inconsistent with the results of Warren (1963), who observed no sialic acids in insects using the thiobarbituric acid method. Gee (1975) also suggested that the diuretic hormone of the tsetse fly *Glossina austeni* contained sialic acid because it lost its biological activity after neuraminidase treatment. A more recent study demonstrated that specific adhesion of *Plasmodium* ookinetes to the midgut epithelium of *Aedes aegypti* involves a midgut carbohydrate ligand and that free N-acetylneuraminic acid competes with the ookinetes in binding assays (Zieler *et al.*, 1999). However, these authors were unable to detect any sialic acids in mosquito midguts using a highly sensitive, HPLC-based fluorometric assay. Scolexin, a

bacterially-induced immune protein specifically found in *Manduca sexta* larvae, has been shown to contain N-acetylneuraminic acid using GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) analysis (Kyriakides *et al.*, 1995).

Neu5Ac-specific lectins have been widely used to examine insect cell proteins for sialic acids, but have provided conflicting results. In one study, Davis and Wood (1995) used MAA and SNA blotting to identify sialylated glycoproteins in established insect cell lines from *Spodoptera frugiperda* (Sf21) and *Trichoplusia ni* (TN-368 and BTI-Tn-5B1-4). However, no proper specificity controls were included in their experiments. In another study, McCarthy and Fletcher (1992) were unable to detect sialic acids in seven different lepidopteran insect cell lines, including Sf21 and TN-368, using LPA (*Limulus polyphemus* agglutinin) agglutination assays. Lopez *et al.* (1999) also found no evidence of sialic acids using SNA and PNA (peanut agglutinin) lectin blotting analysis of endogenous glycoproteins from *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni* and *Mamestra brassicae* and, in this study, the lectin blotting results were confirmed by MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry).

Finally, a precise two-dimensional HPLC and exoglycosidase analysis of membrane glycoprotein glycans from three different lepidopteran insect cell lines (Sf21, IZD-Mb-0503 and Bm-N) revealed no evidence of sialylation (Kubelka *et al.*, 1994).

In summary, the results of most, but not all, of these studies suggest that endogenous insect glycoproteins lack sialic acids. The inconsistency in these results might reflect cell type- and/or developmental stage-specific sialylation events. Indeed, sialic acids have been detected in *Drosophila melanogaster* by cytochemistry using LFA (*Limax flavus* agglutinin) and by a combination of gas-liquid chromatography and electron-impact mass spectrometry (Roth *et al.*, 1992). These authors also used blotting with an anti-polysialic acid antibody to demonstrate that homopolymers of α 2,8 linked sialic acids were expressed only in embryos between 14 and 18 hours of age. These results show that sialic acids do occur in Diptera, and that some forms, e. g. polysialic acid, occur in a developmental stage-specific fashion, as shown previously for polysialylation of the mammalian neuronal adhesion molecule N-CAM (Vimr *et al.*, 1984, Seki and Arai, 1993).

Occurrence of Endogenous Sialyltransferase Activity

Some investigators have used *in vitro* assays with radio-labeled or fluorescent CMP-Neu5Ac as the donor substrate to examine insect cell lysates or subcellular fractions for sialyltransferase activities (Butters *et al.*, 1981, Hooker *et al.*, 1999 and Lopez *et al.*, 1999). No significant sialyltransferase activity has ever been detected in these assays, irrespective of the acceptor substrate used. In contrast, Hiruma and Riddiford (1988) reported that the

granular phenoloxidase of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* was [¹⁴C]-labeled when tissue slices were incubated with [¹⁴C]Neu5Ac.

The difference in these results might reflect insect type- or tissue-specific differences in sialyltransferase activities, differences in established cell lines *versus* intact insects, or protein-specific differences, as the latter study focused on incorporation of radiolabeled sialic acid into a single insect glycoprotein.

Availability of Endogenous CMP-Neu5Ac

Few studies have examined the occurrence of the sialic acid donor, CMP-Neu5Ac, in insect systems. However, Hooker *et al.* (1999) recently reported that they were unable to detect any CMP-Neu5Ac by anion exchange chromatography of the soluble nucleotides extracted from uninfected Sf9, Sf21, or Ea4 cells or from baculovirus-infected Sf9 cells.

Glycoprotein Sialylation during Viral Infection

The granulosis viruses and the nucleopolyhedroviruses, both of which belong to the family Baculoviridae, can infect numerous insect species and are widely studied because of their potential applications both as biological insecticides and as eukaryotic gene expression vectors. The viruses classified within the genus baculovirus all consist of a nucleocapsid surrounded by an envelope, which includes virus-encoded glycoproteins that are translated and modified by the host cell. These glycoproteins can be used conveniently to study insect cellular protein glycosylation machinery because they are usually synthesized in large quantities. Using the lectin LPA, which binds to sialic acids, Russell and Consigli (1985) detected one sialylated glycoprotein synthesized during infection of *Trichoplusia ni* (TN-368) cells with *Plodia interpunctella* granulosis virus. In contrast, several studies of nucleopolyhedroviruses led to the conclusion that no viral glycoproteins were sialylated. Kretzschmar *et al.* (1994) demonstrated that neuraminidase treatment had no effect on the HPLC profile of the N-glycans isolated from baculovirus (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus; AcMNPV)-infected Sf9 cells. They concluded that viral infection does not alter N-glycosylation and that Sf9 cells are not capable of sialylating glycoproteins. Jarvis and Finn (1995) used lectin blotting analysis to examine N-glycosylation of the major AcMNPV envelope glycoprotein, gp64 and found no evidence of sialic acid when gp64 was expressed in three different lepidopteran insect cell lines. However, gp64 was sialylated when it was expressed in mammalian cells. More recently, Jarvis *et al.* (1998b) constructed several gp64 mutants, each of which had only one of the five potential N-glycosylation sites, and found no evidence of sialic acid in any of the individual N-linked glycans by SNA lectin blotting. Finally, as part of their study, Hooker *et al.* (1999) showed that

neither sialyltransferase activity nor CMP-Neu5Ac donor substrate was detectable in baculovirus-infected Sf9 cells, as mentioned above.

In addition to these insect-specific viruses, some animal viruses can grow in a wide variety of cultured cells, including cells of either mammalian or insect origin. This allows for a well-controlled comparison of protein glycosylation by both cell types, as glycosylation of virion proteins is mediated by cellular glycosylation pathways. The sialic acid content of isolated virions can be assayed by simple colorimetric methods. Schloemer and Wagner (1975) showed that sialylation of vesicular stomatitis virus grown in mosquito cells (*Aedes albopictus*) was very low, resulting in markedly reduced hemagglutinating activity. *In vitro* sialylation restored the hemagglutination titre of this virus to levels approaching those of the same virus grown in BHK-21 cells. Impaired sialylation has also been observed for the Semliki forest virus E2 glycoprotein produced by mosquito cells (Stollar, 1980) and purified Sindbis virus grown in mosquito cells, relative to the same virus grown in BHK cells (Stollar *et al.*, 1976; Hirsch *et al.*, 1981).

Thus, these results provide no evidence for significant induction of glycoprotein sialylation pathways during infection of insect cells by a variety of different viruses.

Sialylation of Recombinant Glycoproteins in Baculovirus-Insect Cell Expression Systems

Recombinant baculoviruses are commonly used as vectors for the high level expression of foreign genes under the transcriptional control of the viral polyhedrin or p10 promoters, which are exceptionally strong promoters [for reviews, see Miller (1988), Luckow and Summers (1988), Jarvis (1997), and Altmann *et al.* (1999)]. Examination of baculovirus-expressed glycoproteins for sialylation has provided conflicting results, which we will discuss according to the methods used for sialic acid detection and characterization.

Use of Lectins to Determine Glycan Structures

Vandenbroeck *et al.* (1994) showed that porcine interferon- γ produced by baculovirus-infected Sf9 cells could be stained with SNA and MAA, indicating that this recombinant protein had acquired α 2,3 and α 2,6-linked sialic acids. Similarly, Davis and Wood (1995) reported that human placental secreted alkaline phosphatase (SEAP) produced in Sf21 and TN-368 cell lines reacted with SNA and concluded that this protein had acquired α 2,6-linked sialic acid. This conclusion was weakened by the lack of suitable controls, as discussed above. Similarly, the conclusion that a bovine leukemia virus glycoprotein expressed by recombinant baculovirus-infected insect cells contains sialic acid was weakened by the fact that it was based on the use of WGA (wheat germ agglutinin), which interacts poorly with sialyl residues and has other speci-

ficiencies (Russo *et al.*, 1998). Moreover, the culture medium used in this study contained 5% fetal calf serum, which could be a source of contaminating sialoglycoproteins, as discussed above. Finally, MAA competed with antibodies in a competitive ELISA test on the porcine lutropin receptor ectodomain expressed in Sf9 cells, indicating that this recombinant protein contained α 2,3 sialic acid (Pajot-Augy *et al.*, 1999).

In contrast to these positive results, many investigators have been unable to detect sialic acid residues using lectin-based analyses of insect cell-derived recombinant glycoproteins. Among them, Lehmann *et al.* (1993) used Con A (concanavalin A) affinity chromatography to separate the N-glycans from a secreted, chimeric form of a human parainfluenza virus type 3 glycoprotein produced in Sf9 cells and their results revealed only oligomannosidic- and paucimannosidic glycans. Sialic acids were not found on human interferon ω 1 expressed in Sf9 cells, as the only positive signal in lectin blots was observed with GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin), which recognizes terminal mannose residues (Voss *et al.*, 1993). Sugiyama *et al.* (1993) used lectin blotting with DSA (*Datura stramonium* agglutinin), SNA, MAA and WGA to characterize O-glycosylation of human interferon- α 2 synthesized by Sf9 cells and found no evidence of sialylation. Grossmann *et al.* (1997) expressed the human thyroid stimulating hormone (TSH) in Sf9, Sf21, and BTI-TN-5B1-4 (also known as High Five) cells and detected no terminally sialylated complex oligosaccharides using ConA and LFA. Finally, the WGA lectin blotting results of Van de Wiel *et al.* (1998) suggested that the bovine follicular stimulating hormone (FSH) does not acquire terminal sialic acid when expressed in Sf21 cells.

Use of Physico-Chemical Criteria

Electrophoretic Mobility of Glycoproteins When human melanotransferrin was expressed in baculovirus-infected or stably transfected lepidopteran insect cells (Sf9), neither form of the protein included the higher acid form seen with the native protein produced by human cells. This result was taken by Hegedus *et al.* (1999) as an indication that neither recombinant form of the protein was sialylated by insect cells. The lack of a change in electrophoretic mobility after neuraminidase treatment has also been used to demonstrate the absence of sialic acid in recombinant human complement subcomponent C1s (Luo *et al.*, 1992) and human α 1-microglobulin (Wester *et al.*, 1997), both expressed in Sf9 cells.

Chromatographic Behaviour of Glycans The structures of the O-linked oligosaccharides from a baculovirus-expressed, truncated pseudorabies virus glycoprotein (gp50) were examined by Thomsen *et al.* (1990) using gel filtration and paper chromatography after metabolic labeling. The major carbohydrate structures found in this study were GalNAc and, to a lesser extent, Gal β 1,3GalNAc, but both structures were devoid of sialic acid.

Hsu *et al.* (1997) used two-dimensional HPLC mapping to analyze the N-glycans on IgG produced by baculovirus-infected BTI-TN-5B1-4 (High Five) cells. The results of this study showed that *Trichoplusia ni* cells could produce biantennary N-glycans terminating with galactosyl residues; however, there was no evidence of sialylation.

Expression of recombinant human plasminogen has been studied in several insect cell lines, including *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21AE (Davidson *et al.*, 1990 and Davidson and Castellino, 1991a), *Mamestra brassicae* IZD-MbO503 (Davidson and Castellino, 1991b), and *Manduca sexta* CM-1 (Davidson and Castellino, 1991b). These investigators used HPAEC analyses to examine the structures of the N-glycans on the recombinant plasminogen produced by these cells. The results revealed that the protein contained significant proportions of sialylated, complex N-linked oligosaccharides. The same results were obtained whether the cells were cultured in serum-containing or serum-free media. To date, this remains the only example in which high levels of sialylated complex oligosaccharides were observed by direct structural analyses of the glycans from an insect cell-derived glycoprotein. Synthesis of these complex-type oligosaccharides was shown to be dependent on the elapsed post-infection time (Davidson and Castellino, 1991a). It has been suggested that human plasminogen might be a particularly good substrate for limited amounts of terminal processing enzymes and/or a particularly poor substrate for the processing N-acetylglucosaminidase found in these cells. These observations imply that insect cells have the glycosyltransferase genes required for the assembly of complex N-linked oligosaccharides and that these genes can be expressed during infection. However, using this same method of glycan analysis (HPAEC), Butters *et al.*, (1998) found no evidence of sialylated species among the N-glycans from HIVgp120 expressed in Sf9 cells.

Glycan Analysis by Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) Sialylation of secreted alkaline phosphatase (SeAP) produced in *Trichoplusia ni* larvae, which had been detected by lectin blotting (Davis and Wood, 1995), was reinvestigated by this same group (Kulakosky *et al.*, 1998) using the FACE method. This analysis failed to confirm the presence of sialyl residues on SeAP, irrespective of the host used for production, which included a variety of established cell lines (*Lymantria dispar*, *Heliothis virescens*, *Bombyx mori*) and larvae (*Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *H. virescens*, *B. mori* and *Danaus plexippus*). According to the authors, the discrepancy between their FACE and lectin blotting results could have resulted either from coimmunoprecipitation of a contaminating sialylated glycoprotein of the same molecular mass or from non-specific binding in their lectin blots. By adding mannosamine, which can increase intracellular sugar nucleotide pools, Donaldson *et al.* (1999) demonstrated that N-glycosylation of SeAP in

Sf21 cells was extended to include terminal N-acetylglucosamine, but neither galactosylated nor sialylated structures were detected.

Glycan Analysis by Mass Spectrometry Mass spectrometry, which is one of the most powerful tools available for carbohydrate structural determinations, has been used since 1993 to characterize O- and N-linked glycans on insect cell-derived recombinant glycoproteins. Using plasma desorption mass spectrometry Sugiyama *et al.* (1993) found no evidence of sialylated O-glycans on human interferon $\alpha 2$ produced in Sf9 cells. Fast atom bombardment mass spectrometry of glycopeptides allowed Grabenhorst *et al.* (1993) to demonstrate that human interleukin-2 from baculovirus-infected Sf21 cells contained exclusively fucosylated paucimannose type N-glycans. The N-glycans on interferon γ produced by two insect cell lines (Ea4 and Sf9) were studied by matrix-assisted laser desorption/time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Ogonah *et al.*, 1996). Whereas the recombinant protein produced by Sf9 cells had only paucimannose-type glycans (see also Hooker *et al.*, 1999), the same protein produced by Ea4 cells contained N-glycans with terminal GlcNAc and Gal residues. However, even the Ea4 cells failed to produce N-glycans containing sialic acid. This same method was used to demonstrate that human lactoferrin produced by baculovirus-infected Sf9 cells had only non-sialylated, truncated N-glycans (Salmon *et al.*, 1997). MALDI and electrospray mass spectrometry analyses allowed Lopez *et al.* (1997) to elucidate the structures of the N-glycans on baculovirus-expressed bovine lactoferrin produced in *Mamestra brassicae* cells. Two families of oligosaccharides were found: one consisted of oligomannosidic type glycans (Man_9 to $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) and the other consisted of short, partially fucosylated paucimannose-type glycans, but none were sialylated. Most recently, Rudd *et al.* (2000) used MALDI-TOF to demonstrate the presence of a subpopulation of terminally galactosylated N-glycans on the third eight-cysteine domain of the latent transforming growth factor- β binding protein-1 expressed in baculovirus-infected High Five cells. However, they detected no sialylated structures.

Engineering Glycoprotein Processing Pathways in the Baculovirus-Insect Cell Expression System

Considering that the vast majority of N-glycans on glycoproteins synthesized by insect cells are of the oligomannosidic or paucimannosidic type, the relative inability of these cells to produce sialylated glycoproteins could reflect the absence of functional levels of terminal glycosyltransferases in these cells. This idea led some investigators to attempt to modify the protein N-glycosylation pathway in baculovirus-infected insect cells by introducing exogenous glycosyltransferase activities into the system (for a general review, see Jarvis *et al.*, 1998a).

Wagner *et al.* (1996b) demonstrated that the N-glycans of fowl-plague hemagglutinin expressed in Sf9 cells could be elongated by coexpression of human $\beta 1,2$ -N-acetylglucosaminyltransferase I (GNT-I). These authors used two different recombinant baculoviruses, one expressing the hemagglutinin and the other expressing the human GNT-I gene, to coinfect Sf9 cells. Glycosylation of hemagglutinin was evaluated by a terminal galactosylation assay and HPAEC analyses. The results indicated that human GNT-I coexpression resulted in the production of hemagglutinin molecules with a four-fold higher content of N-glycans containing terminal GlcNAc residues. However, completely galactosylated and sialylated complex-type oligosaccharide side chains were not observed. In another study, Jarvis and Finn (1996) used a new type of baculovirus vector that can express foreign genes immediately after infection under the control of the promoter from the baculoviral *ie1* gene to express bovine $\beta 1,4$ -galactosyltransferase. This resulted in galactosylation of the viral glycoprotein, gp64, as demonstrated by RCA (*Ricinus communis* agglutinin) lectin blotting with appropriate controls. The same results were obtained when Sf9 cells were stably transformed to constitutively express bovine $\beta 1,4$ -galactosyltransferase, then infected with wild type AcMNPV (Hollister *et al.*, 1998). Infection of these stably-transformed cells (Sf $\beta 4$ GalT) with a conventional recombinant baculovirus expression vector encoding human plasminogen activator also resulted in galactosylation of the recombinant protein, as evidenced by RCA blotting. However, upregulation of galactosyltransferase activity failed to produce any glycoproteins that bound to SNA, indicating that this did not induce production of $\alpha 2,6$ -sialylated glycoproteins. In their review article, Jarvis *et al.* (1998a) reported that infection of Sf $\beta 4$ GalT cells with an immediate early baculovirus vector encoding a mammalian $\alpha 2,6$ -sialyltransferase under the transcriptional control of the *ie1* promoter resulted in production of gp64 that bound specifically to both RCA and SNA. These findings (Hollister and Jarvis, 2001) suggest that up-regulation of both transferase activities allows Sf9 cells to produce a foreign glycoprotein with N-linked glycans containing both β -linked galactose and terminal $\alpha 2,6$ -linked sialic acid. It is important to note that this conclusion implies that Sf9 cells can produce and transport CMP-sialic acid, which is required for glycoprotein sialylation in addition to the sialyltransferase activity. This implication is not supported by the results of Hooker *et al.* (1999), who were unable to detect CMP-sialic acid in uninfected or infected Sf9 cells, as discussed above. Based on this finding, the latter group concluded that genetic modification of N-glycan processing in Sf9 cells will be constrained to terminal galactosylation. Hopefully, future studies will clarify the discrepancy between these two different viewpoints.

Conclusion

Compared to polypeptides and nucleic acids, primary structural analysis of glycans is far more complicated due to the huge diversity of linkages between monosaccharides.

Methods of glycan structural analysis include colormetry, endo- and exoglycosidase digestions, permethylation and analysis of methylated monosaccharides by gas-liquid chromatography, the use of lectins with well-defined carbohydrate-binding specificities, and various chromatographic methods, particularly HPLC and HPAEC. However, the application of NMR and mass spectrometry methods has provided a technical leap in glycan structural analysis. These latter methods have been used to establish that insect cells can modify proteins by both O- and N-glycosylation. In addition, these methods have established that the major processed O- and N-glycan species found on endogenous and most baculovirus-expressed recombinant glycoproteins are (Gal β 1,3)GalNAc-O-Ser/Thr and Man3(Fuc)GlcNAc2-N-Asn, respectively. Among the results obtained using other technical approaches, some suggest that insects can produce sialylated glycoproteins, whereas most suggest that they cannot. There are many potential reasons for the inconsistency in these results, including differences in the sources and nature of materials used for analysis. Some studies have focused on insect cell lines, others on insects. Many different cell lines, derived from different insects, different tissues, and cultured under different conditions have been used for these studies. Some studies have examined glycans from total glycoprotein fractions, some from total membrane glycoprotein fractions, and most have focused on a single, purified model glycoprotein. Among the purified model proteins, some studies have examined endogenous proteins, while others have examined recombinant proteins. Other potential reasons for the different conclusions from different studies could include experimental artifacts, such as the loss of sialic acids, the introduction of sialic acids or sialoglycoproteins, or the absence of proper experimental controls, as discussed above. Finally, it is imperative to recognize that it is extremely difficult to generalize about protein glycosylation pathways in 'insect cells', as insects are an incredibly diverse group of animals. Nonetheless, even with all these caveats, we may still conclude that the production and compartmentalization of sialic acids and glycoprotein sialylation are not major biochemical processes in insect cells. To explain the exceptional observations of sialic acids or sialoglycoproteins in insects, we can speculate that these processes might be highly specialized or might occur only in a tissue- or developmental stage-specific fashion. Similarly, we can speculate that these processes might occur at only nominal, usually undetectable levels in established insect cell lines and, on rare occasions, these low level processes can yield sialylated glycoproteins. The overall conclusion that insect cells generally do not produce sialylated glycoproteins, with rare exceptions among specialized cells or individual model glycoproteins, is consistent with the results of all well-analyzed studies in the current literature.

Based on these conclusions, the development of engineered insect cells able to perform mammalian-type glycosylation can still be considered as a promising field. One can expect that the introduction of mammalian genes encoding not only glycosyltransferases but also the enzymes responsible for sugar-nucleotides (especially CMP-sialic acid, as the endogenous pool must be very reduced) biosynthesis and transport can significantly modify the glycosylation pattern of insect cell-derived glycoproteins. However, since insects seem to possess the genetic potential to perform complex-type glycosylation, which will hopefully be confirmed by future genetic studies, another direction for metabolic engineering of insect cell glycosylation will be to manipulate the expression levels of endogenous glycoprotein-processing enzymes. These new developments will require basic molecular studies to understand the factors that govern the precise regulation of the genes involved in complex-type glycan synthesis.

lylated glycoproteins, with rare exceptions among specialized cells or individual model glycoproteins, is consistent with the results of all well-analyzed studies in the current literature.

Acknowledgements

We are very thankful to Professor Philippe Delannoy for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de la Technologie, by the Université des Sciences et Technologies de Lille, and by grants from the American National Institutes of Health (GM-49734) and National Science Foundation (BES 98-14157).

References

- Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glossl, J. and März, L. (1995). Insect cells contain an unusual, membrane-bound beta-N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans. *J. Biol. Chem.* **270**, 17344–17349.
- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B.H. and März, L. (1999). Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj. J.* **16**, 109–123.
- Butters, T.D., Hughes, R.C. and Vischer, P. (1981). Steps in the biosynthesis of mosquito cell membrane glycoproteins and the effects of tunicamycin. *Biochim. Biophys. Acta* **640**, 672–686.
- Butters, T.D., Yudkin, B., Jacob, G.S. and Jones, I.M. (1998). Structural characterization of the N-linked oligosaccharides derived from HIVgp120 expressed in lepidopteran cells. *Glycoconj. J.* **15**, 83–88.
- 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). Asparagine-linked oligosaccharide processing in lepidopteran insect cells. Temporal dependence of the nature of the oligosaccharides assembled on asparagine-289 of recombinant human plas-

- minogen produced in baculovirus vector infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE) cells. *Biochemistry* 30, 6165–6174.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991b). Structures of the asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a *Mamestra brassicae* cell line (IZD-MB0503). *Biochemistry* 30, 6689–6696.
- 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.
- Donaldson, M., Wood, H.A., Kulakosky, P.C. and Shuler, M.L. (1999). Use of mannosamine for inducing the addition of outer arm N-acetylglucosamine onto N-linked oligosaccharides of recombinant proteins in insect cells. *Biotechnol. Prog.* 15, 168–173.
- Eckhardt, M., Muehlenhoff, M., Bethe, A., and Gerardy-Schahn, R. (1996). Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7572–7576.
- Gee, J.D. (1975). The control of diuresis in the tsetse fly *Glossina austeni*: a preliminary investigation of the diuretic hormone. *J. Exp. Biol.* 63, 391–401.
- Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimtz, M., Jager, V. and Conradt, H.S. (1993). Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glycoprotein variants from baculovirus-infected Sf21 cells. Characterization of polypeptides and posttranslational modifications. *Eur. J. Biochem.* 215, 189–197.
- Grossmann, M., Wong, R., Teh, N.G., Tropea, J.E., East-Palmer, J., Weintraub, B.D. and Szkudlinski, M.W. (1997). Expression of biologically active human thyrotropin (hTSH) in a baculovirus system: effect of insect cell glycosylation on hTSH activity *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* 138, 92–100.
- Harduin-Lepers, A., Recchi, M.A. and Delannoy, P. (1995). 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology* 5, 741–758.
- Hegedus, D.D., Pfeifer, T.A., Theilmann, D.A., Kennard, M.L., Gabathuler, R., Jefferies, W.A. and Grigliatti, T.A. (1999). Differences in the expression and localization of human melanotransferrin in lepidopteran and dipteran insect cell lines. *Protein Expr. Purif.* 15, 296–307.
- Hirsch, R.L., Griffin, D.E. and Winkelstein, J.A. (1981). Host modification of Sindbis virus sialic acid content influences alternative complement pathway activation and virus clearance. *J. Immunol.* 127, 1740–1743.
- Hirschberg, C.B., Robbins, P.W. and Abeijon, C. (1998). Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 49–69.
- Hiruma, K. and Riddiford, L.M. (1988). Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm: regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone. *Dev. Biol.* 130, 87–97.
- Hollister, J.R., and Jarvis, D.L. (2001). Engineering Lepidopteran insect cells for sialoglycoprotein production by genetic transformation with mammalian β 1,4-galactosyltransferase and α 2,6-sialyltransferase genes. *Glycobiology*, in press.
- Hollister, J.R., Shaper, J.H. and Jarvis, D.L. (1998). Stable expression of mammalian beta 1,4-galactosyltransferase extends the N-glycosylation pathway in insect cells. *Glycobiology* 8, 473–480.
- Hooker, A.D., Green, N.H., Baines, A.J., Bull, A.T., Jenkins, N., Strange, P.G. and James, D.C. (1999). Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN-gamma in Chinese hamster ovary and insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 559–572.
- Hsu, T.A., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Kato, K., Shimada, I., Masuda, K., Whiteley, E.M., Fan, J.Q., Lee, Y.C. and Betenbaugh, M.J. (1997). Differential N-glycan patterns of secreted and intracellular IgG produced in *Trichoplusia ni* cells. *J. Biol. Chem.* 272, 9062–9070.
- Jarvis, D.L. (1997). Baculovirus expression vectors. In: *The Baculoviruses*, L.K. Miller, ed. (New York: Plenum Publishing Corporation) pp. 389–431.
- Jarvis, D.L. and Finn, E.E. (1996). Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. *Nature Biotechnol.* 14, 1288–1292.
- Jarvis, D.L. and Finn, E.E. (1995). Biochemical analysis of the N-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells. *Virology* 212, 500–511.
- Jarvis, D.L., Kawar, Z.S. and Hollister, J.R. (1998a). Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 528–533.
- Jarvis, D.L., Wills, L., Burow, G. and Bohlmeier, D.A. (1998b). Mutational analysis of the N-linked glycans on *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus gp64. *J. Virol.* 72, 9459–9469.
- Kamat, D.N. (1971). The occurrence of sialic acids in invertebrates. *Folia. Histochem. Cytochem. (Krakow)* 9, 189–192.
- Kean, E.L. (1991). Sialic acid activation. *Glycobiology* 1, 441–447.
- 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, 23–27.
- 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.
- Kulakosky, P.C., Hughes, P.R. and Wood, H.A. (1998). N-Linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. *Glycobiology* 8, 741–745.
- Kyriakides, T.R., McKillip, J.L. and Spence, K.D. (1995). Biochemical characterization, developmental expression, and induction of the immune protein scolexin from *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29, 269–280.
- Lehman, D.J., Roof, L.L., Brideau, R.J., Aeed, P.A., Thomsen, D.R., Elhammer, A.P., Wathen, M.W. and Homa, F.L. (1993). Comparison of soluble and secreted forms of human parainfluenza virus type 3 glycoproteins expressed from mammalian and insect cells as subunit vaccines. *J. Gen. Virol.* 74, 459–469.
- 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.
- Lopez, M., Coddeville, B., Langridge, J., Plancke, Y., Sautiere, P., Chaabihi, 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, 635–651.
- Lopez, M., Tetaert, D., Juliant, S., Gazon, M., Cerutti, M., Verbert, A. and Delannoy, P. (1999). O-glycosylation potential of lepidopteran insect cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1427, 49–61.
- Luckow, L.A. and Summers, M.D. (1988). Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology* 6, 47–55.
- Luo, C., Thielens, N.M., Gagnon, J., Gal, P., Sarvari, M., Tseng, Y., Tosi, M., Zavodszky, P., Arlaud, G.J. and Schumaker, V.N. (1992). Recombinant human complement subcomponent C1s lacking beta-hydroxyasparagine, sialic acid, and one of its two carbohydrate chains still reassembles with C1q and C1r to form a functional C1 complex. *Biochemistry* 31, 4254–4262.

- März, L., Altmann, F., Staudacher, E. and Kubelka, V. (1995). Protein glycosylation in insects. In: *Glycoproteins*, J. Montreuil, H. Schachter, and J.F.G. Vliegthart, eds. (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier) pp. 543–563.
- Marchal, I., Mir, A.M., Kmiecik, D., Verbert, A. and Cacan, R. (1999). Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of N-glycans synthesized by insect cells: a metabolic study with Sf9 cell line. *Glycobiology* 9, 645–654.
- McCarthy, W.J. and Fletcher, K.A. (1992). Cell-surface glycoconjugate diversity among lepidopteran cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A, 700–702.
- Miller, L.K. (1988). Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 177–199.
- Münster, A.-K., Eckhardt, M., Potvin, B., Mühlenhoff, M., Stanley, P. and Gerardy-Schahn, R. (1998). Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: A nuclear protein with evolutionarily conserved motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9140–9145.
- Ogonah, O.W., 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 glycoproteins. *Bio/Technology* 14, 197–202.
- Pajot-Augy, E., Bozon, V., Remy, J.J., Couture, L. and Salesse, R. (1999). Critical relationship between glycosylation of recombinant lutropin receptor ectodomain and its secretion from baculovirus-infected insect cells. *Eur. J. Biochem.* 260, 635–648.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R. and Gehring, W.J. (1992). Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* 256, 673–675.
- Rudd, P.M., Downing, A.K., Cadene, M., Harvey, D.J., Wormald, M.R., Weir, I., Dwek, R.A., Rifkin, D.B. and Gleizes, P.E. (2000). Hybrid and complex glycans are linked to the conserved N-glycosylation site of the third eight-cysteine domain of LTPB-1 in insect cells. *Biochemistry* 39, 1596–1603.
- Russell, D.L. and Consigli, R.A. (1985). Glycosylation of purified enveloped nucleocapsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella* as determined by lectin binding. *Virus Res.* 4, 83–91.
- Russo, S., Montermini, L., Berkovitz-Siman-Tov, R., Ponti, W. and Poli, G. (1998). Expression of bovine leukemia virus ENV glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus. *FEBS Lett.* 436, 11–16.
- Salmon, V., Legrand, D., Georges, B., Slomianny, M.C., Coddeville, B. and Spik, G. (1997). Characterization of human lactoferrin produced in the baculovirus expression system. *Protein Expr. Purif.* 9, 203–210.
- Schloemer, R.H. and Wagner, R.R. (1975). Mosquito cells infected with vesicular stomatitis virus yield unsialylated virions of low infectivity. *J. Virol.* 15, 1029–1032.
- Seki, T. and Arai, Y. (1993). Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci. Res.* 17, 265–290.
- Stollar, V. (1980). Togaviruses in cultured arthropode cells. In: *The togaviruses: Biology, Structure, Replication* R.W. Schlesinger, ed. (New York, USA: Academic Press), pp. 584–622.
- Stollar, V., Stollar, B.D., Koo, R., Harrap, K.A. and Schlesinger, R.W. (1976). Sialic acid contents of sindbis virus from vertebrate and mosquito cells. Equivalence of biological and immunological viral properties. *Virology* 69, 104–115.
- Sugiyama, K., Ahorn, H., Maurer-Fogy, I. and Voss, T. (1993). Expression of human interferon-alpha 2 in Sf9 cells. Characterization of O-linked glycosylation and protein heterogeneities. *Eur. J. Biochem.* 217, 921–927.
- 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.
- Vadgama, M.R. and Kamat, D.N. (1969). Sialic acids in the salivary glands of some insects with different feeding habits. *Histochemie* 19, 184–188.
- Van de Wiel, D.F., Van Rijn, P.A., Meloen, R.H. and Moormann, R.J. (1998). High-level expression of biologically active recombinant bovine follicle stimulating hormone in a baculovirus system. *J. Mol. Endocrinol.* 20, 83–98.
- Vandenbroeck, K., Willems, L., Billiau, A., Opendakker, G. and Huybrechts, R. (1994). Glycoform heterogeneity of porcine interferon-gamma expressed in Sf9 cells. *Lymphokine Cytokine Res.* 13, 253–258.
- Vimr, E.R., McCoy, R.D., Vollger, H.F., Wilkison, N.C. and Troy, F.A. (1984). Use of prokaryotic-derived to identify poly(sialic acid) in neonatal neuronal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1971–1975.
- Voss, T., Ergülen, E., Ahorn, H., Kubelka, V., Sugiyama, K., Maurer-Fogy, I. and Glossl, J. (1993). Expression of human interferon omega 1 in Sf9 cells. No evidence for complex-type N-linked glycosylation or sialylation. *Eur. J. Biochem.* 217, 913–919.
- Wagner, R., Geyer, H., Geyer, R. and Klenk, H.D. (1996a). N-acetyl-beta-glucosaminidase accounts for differences in glycosylation of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells from a baculovirus vector. *J. Virol.* 70, 4103–4109.
- Wagner, R., Liedtke, S., Kretzschmar, E., Geyer, H., Geyer, R. and Klenk, H.D. (1996b). Elongation of the N-glycans of fowl plague virus hemagglutinin expressed in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells by coexpression of human beta 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I. *Glycobiology* 6, 165–175.
- Warren, L. (1963). The distribution of sialic acids in nature. *Comp. Biochem. Physiol.* 10, 153–171.
- Wester, L., Johansson, M.U. and Akerstrom, B. (1997). Physicochemical and biochemical characterization of human alpha 1-microglobulin expressed in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* 11, 95–103.
- Zieler, H., Nawrocki, J.P. and Shahabuddin, M. (1999). *Plasmodium gallinaceum* ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of *Aedes aegypti* by interaction with a carbohydrate ligand. *J. Exp. Biol.* 202, 485–495.

Références
bibliographiques

- Abeijon, C. & Hirschberg, C. B. (1992). Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* **17**(1), 32-6.
- Aeed, P. A. & Elhammer, A. P. (1994). Glycosylation of recombinant prorenin in insect cells: the insect cell line Sf9 does not express the mannose 6-phosphate recognition signal. *Biochemistry* **33**(29), 8793-7.
- Ailor, E., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Masuda, K., Rahman, B. A., Jarvis, D. L., Lee, Y. C. & Betenbaugh, M. J. (2000). N-glycan patterns of human transferrin produced in *Trichoplusia ni* insect cells: effects of mammalian galactosyltransferase. *Glycobiology* **10**(8), 837-47.
- Altmann, F., Kornfeld, G., Dalik, T., Staudacher, E. & Glossl, J. (1993). Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. N- acetylglucosaminyltransferase I and II activities in cultured lepidopteran cells. *Glycobiology* **3**(6), 619-25.
- Altmann, F. & Marz, L. (1995). Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells: evidence for alpha-mannosidase II. *Glycoconj J* **12**(2), 150-5.
- Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glossl, J. & Marz, L. (1995). Insect cells contain an unusual, membrane-bound beta-N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans. *J Biol Chem* **270**(29), 17344-9.
- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B. & Marz, L. (1999). Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J* **16**(2), 109-23.
- Ascherio, A., Zhang, S. M., Hernan, M. A., Olek, M. J., Coplan, P. M., Brodovicz, K. & Walker, A. M. (2001). Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis. *N Engl J Med* **344**(5), 327-32.
- Ashwell, G. & Harford, J. (1982). Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* **51**, 531-54.
- Azzouz, N., Kedees, M. H., Gerold, P., Becker, S., Dubremetz, J. F., Klenk, H. D., Eckert, V. & Schwarz, R. T. (2000). An early step of glycosylphosphatidyl-inositol anchor biosynthesis is abolished in lepidopteran insect cells following baculovirus infection. *Glycobiology* **10**(2), 177-83.
- Benting, J., Lecat, S., Zacchetti, D. & Simons, K. (2000). Protein expression in *Drosophila* Schneider cells. *Anal Biochem* **278**(1), 59-68.
- Bhatia, P. K. & Mukhopadhyay, A. (1999). Protein glycosylation: implications for in vivo functions and therapeutic applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **64**, 155-201.
- Blanken, W. M., van Vliet, A. & van den Eijnden, D. H. (1984). Branch specificity of bovine colostrum and calf thymus UDP-Gal: N- acetylglucosaminide beta-1,4-galactosyltransferase. *J Biol Chem* **259**(24), 15131-5.
- Blissard, G. W. & Rohrmann, G. F. (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev Entomol* **35**, 127-55.
- Boublik, Y., Di Bonito, P. & Jones, I. M. (1995). Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnology (N Y)* **13**(10), 1079-84.
- Bratosin, D., Mazurier, J., Debray, H., Lecocq, M., Boilly, B., Alonso, C., Moisei, M., Motas, C. & Montreuil, J. (1995). Flow cytofluorimetric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lectins. Evidence that sialic acids control their life span. *Glycoconj J* **12**(3), 258-67.

- Breitbach, K. & Jarvis, D. L. (2001). Improved glycosylation of a foreign protein by Tn-5B1-4 cells engineered to express mammalian glycosyltransferases. *Biotechnol Bioeng* **74**(3), 230-9.
- Brockhausen, I. (1995). Biosynthesis of O-glycans of the N-acetylglucosamine- α -Ser-Thr linkage type. In *Glycoproteins - New comprehensive biochemistry* (Montreuil, J., Vliegenthart, J. F. G. & Schachter, H., eds.), Vol. 29a, pp. 201-259. Elsevier Science, Amsterdam.
- Buscaglia, C. A., Campetella, O., Leguizamon, M. S. & Frasch, A. C. (1998). The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. *J Infect Dis* **177**(2), 431-6.
- Buschiazzo, A., Tavares, G. A., Campetella, O., Spinelli, S., Cremona, M. L., Paris, G., Amaya, M. F., Frasch, A. C. & Alzari, P. M. (2000). Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. *Embo J* **19**(1), 16-24.
- Butters, T. D., Hughes, R. C. & Vischer, P. (1981). Steps in the biosynthesis of mosquito cell membrane glycoproteins and the effects of tunicamycin. *Biochim Biophys Acta* **640**(3), 672-86.
- Butters, T. D., Yudkin, B., Jacob, G. S. & Jones, I. M. (1998). Structural characterization of the N-linked oligosaccharides derived from HIVgp120 expressed in lepidopteran cells. *Glycoconj J* **15**(1), 83-8.
- Cacan, R. & Verbert, A. (1995). Metabolic labelling of animal cell culture. In *Methods on Glycoconjugates - a laboratory manual* (Verbert, A., ed.), pp. 179-183. Harwood academic publishers.
- Cahoreau, C., Garnier, L., Djiane, J., Devauchelle, G. & Cerutti, M. (1994). Evidence for N-glycosylation and ubiquitination of the prolactin receptor expressed in a baculovirus-insect cell system. *FEBS Lett* **350**(2-3), 230-4.
- Campetella, O. E., Uttaro, A. D., Parodi, A. J. & Frasch, A. C. (1994). A recombinant *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase lacking the amino acid repeats retains the enzymatic activity. *Mol Biochem Parasitol* **64**(2), 337-40.
- Cecchelli, R., Cacan, R., Porchet-Hennere, E. & Verbert, A. (1986). Dilatation of Golgi vesicles by monensin leads to enhanced accumulation of sugar nucleotides. *Biosci Rep* **6**(2), 227-34.
- Chaabihi, H. (1992). Etude de la régulation des gènes P10 et polyédrique du baculovirus d'*Autographa californica* et développement de nouveaux vecteurs pour l'expression de gènes étrangers. Thèse, Université d'Aix-Marseille II, Faculté des Sciences de Luminy, France.
- Chaabihi, H., Fournier, D., Fedon, Y., Bossy, J. P., Ravallec, M., Devauchelle, G. & Cerutti, M. (1994). Biochemical characterization of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase expressed by recombinant baculoviruses. *Biochem Biophys Res Commun* **203**(1), 734-42.
- Chaves, L. B., Briones, M. R. & Schenkman, S. (1993). Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **61**(1), 97-106.
- Chen, W. Y., Shen, Q. X. & Bahl, O. P. (1991). Carbohydrate variant of the recombinant beta-subunit of human choriogonadotropin expressed in baculovirus expression system. *J Biol Chem* **266**(7), 4081-7.
- Cheng, X., Cole, R. N., Zaia, J. & Hart, G. W. (2000). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry* **39**(38), 11609-20.
- Chitlaru, T., Kronman, C., Zeevi, M., Kam, M., Harel, A., Ordentlich, A., Velan, B. & Shafferman, A. (1998). Modulation of circulatory residence of recombinant

- acetylcholinesterase through biochemical or genetic manipulation of sialylation levels. *Biochem J* **336**(Pt 3), 647-58.
- Chuenkova, M., Pereira, M. & Taylor, G. (1999). trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*: location of galactose-binding site(s). *Biochem Biophys Res Commun* **262**(2), 549-56.
- Chuenkova, M. V. & Pereira, M. A. (2000). A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis of neuronal cells. *Mol Biol Cell* **11**(4), 1487-98.
- Chui, D., Oh-Eda, M., Liao, Y. F., Panneerselvam, K., Lal, A., Marek, K. W., Freeze, H. H., Moremen, K. W., Fukuda, M. N. & Marth, J. D. (1997). Alpha-mannosidase-II deficiency results in dyserythropoiesis and unveils an alternate pathway in oligosaccharide biosynthesis. *Cell* **90**(1), 157-67.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W. & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(11), 3240-4.
- Cointe, D., Beliard, R., Jorieux, S., Leroy, Y., Glacet, A., Verbert, A., Bourel, D. & Chirat, F. (2000). Unusual N-glycosylation of a recombinant human erythropoietin expressed in a human lymphoblastoid cell line does not alter its biological properties. *Glycobiology* **10**(5), 511-9.
- Colley, K. J. (1997). Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* **7**(1), 1-13.
- Cornelis, P. (2000). Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr Opin Biotechnol* **11**(5), 450-4.
- Cross, G. A. & Takle, G. B. (1993). The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* **47**, 385-411.
- Cumming, D. A. (1991). Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. *Glycobiology* **1**(2), 115-30.
- Davidson, D. J. & Castellino, F. J. (1991a). 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**(25), 6165-74.
- Davidson, D. J. & Castellino, F. J. (1991b). Structures of the asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a *Mamestra brassicae* cell line (IZD-MBO503). *Biochemistry* **30**(27), 6689-96.
- Davidson, D. J., Fraser, M. J. & Castellino, F. J. (1990). Oligosaccharide processing in the expression of human plasminogen cDNA by lepidopteran insect (*Spodoptera frugiperda*) cells. *Biochemistry* **29**(23), 5584-90.
- Davis, T. R. & Wood, H. A. (1995). Intrinsic glycosylation potentials of insect cell cultures and insect larvae. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **31**(9), 659-63.
- Devauchelle, G. & Cerutti, M. (1993). Les Baculovirus d'insectes vecteurs d'expression de gènes étrangers. *Regard sur la Biochimie* **1**, 57-65.
- Devauchelle, G. & Cerutti, M. (1999). [Baculovirus: an example of an insect virus of use to humans]. *Med Trop (Mars)* **59**(4 Pt 2), 517-21.
- Dinter, A. & Berger, E. G. (1998). Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* **109**(5-6), 571-90.
- Dodet, B. (1990). Production de protéines recombinantes: quel système choisir? *Biofutur*(juin), 20-29.

- Dodet, B. (1992). La mise sur la marché des médicaments recombinants. *Biofutur*(novembre), 16-27.
- Donaldson, M., Wood, H. A., Kulakosky, P. C. & Shuler, M. L. (1999). Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line: influence of ammonia, time of harvest, temperature, and dissolved oxygen. *Biotechnol Bioeng* **63**(3), 255-62.
- Donaldson, M. S. & Shuler, M. L. (1999). The use of lectins to select subpopulations of insect cells. *Biotechnol Bioeng* **64**(5), 616-9.
- Eckart, M. R. & Bussineau, C. M. (1996). Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr Opin Biotechnol* **7**(5), 525-30.
- Egima, C. M., Briones, M. R., Freitas Junior, L. H., Schenkman, R. P., Uemura, H. & Schenkman, S. (1996). Organization of trans-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **77**(2), 115-25.
- Engstler, M., Schauer, R. & Brun, R. (1995). Distribution of developmentally regulated trans-sialidasés in the Kinetoplastida and characterization of a shed trans-sialidase activity from procyclic *Trypanosoma congolense*. *Acta Trop* **59**(2), 117-29.
- Ernst, W. J., Spenger, A., Toellner, L., Katinger, H. & Grabherr, R. M. (2000). Expanding baculovirus surface display. Modification of the native coat protein gp64 of *Autographa californica* NPV. *Eur J Biochem* **267**(13), 4033-9.
- Faure, A., Rolland, G. & Chtourou, S. (1991). Protéines de recombinaison ou protéines d'extraction? Le cas du facteur VIII. *Biofutur*(juillet/août), 33-37.
- Ferguson, M. A. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* **112**(Pt 17), 2799-809.
- Ferguson, M. A. & Williams, A. F. (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem* **57**, 285-320.
- Ferrero-Garcia, M. A., Trombetta, S. E., Sanchez, D. O., Reglero, A., Frasch, A. C. & Parodi, A. J. (1993). The action of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on glycolipids and glycoproteins. *Eur J Biochem* **213**(2), 765-71.
- Fischer, H. D., Gonzalez-Noriega, A., Sly, W. S. & Morre, D. J. (1980). Phosphomannosyl-enzyme receptors in rat liver. Subcellular distribution and role in intracellular transport of lysosomal enzymes. *J Biol Chem* **255**(20), 9608-15.
- Frasch, A. C. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* **16**(7), 282-6.
- Fraser, M. J. (1992). The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system. *Curr Top Microbiol Immunol* **158**(9), 131-72.
- Frevert, U., Schenkman, S. & Nussenzweig, V. (1992). Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **60**(6), 2349-60.
- Fussenegger, M., Bailey, J. E., Hauser, H. & Mueller, P. P. (1999). Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells. *Trends Biotechnol* **17**(1), 35-42.
- Galili, U. (1993). Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* **14**(10), 480-2.
- Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Chrispeels, M. J., Armentia, A., Salcedo, G. & Gomez, L. (1996). Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology* **6**(4), 471-7.

- Garnier, L., Ravallec, M., Blanchard, P., Chaabihi, H., Bossy, J. P., Devauchelle, G., Jestin, A. & Cerutti, M. (1995). Incorporation of pseudorabies virus gD into human immunodeficiency virus type 1 Gag particles produced in baculovirus-infected cells. *J Virol* **69**(7), 4060-8.
- Geisse, S., Gram, H., Kleuser, B. & Kocher, H. P. (1996). Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expr Purif* **8**(3), 271-82.
- Geisse, S. & Kocher, H. P. (1999). Protein expression in mammalian and insect cell systems. *Methods Enzymol* **306**(2), 19-42.
- Gemmill, T. R. & Trimble, R. B. (1999). Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* **1426**(2), 227-37.
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. & Carter, A. (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* **18**(11), 1151-5.
- Goochee, C. F. & Monica, T. (1990). Environmental effects on protein glycosylation. *Biotechnology (N Y)* **8**(5), 421-7.
- Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimtz, M., Jager, V. & Conradt, H. S. (1993). Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glycoprotein variants from baculovirus-infected Sf21 cells. Characterization of polypeptides and posttranslational modifications. *Eur J Biochem* **215**(1), 189-97.
- Grabherr, R., Ernst, W., Doblhoff-Dier, O., Sara, M. & Katinger, H. (1997). Expression of foreign proteins on the surface of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Biotechniques* **22**(4), 730-5.
- Grabherr, R., Ernst, W., Oker-Blom, C. & Jones, I. (2001). Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trends Biotechnol* **19**(6), 231-6.
- Grace, T. (1962). Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature* **195**(4843), 788-789.
- Gros, F. (1992). *L'ingénierie du vivant*, Editions Odile Jacob, Paris.
- Grossmann, M., Wong, R., Teh, N. G., Tropea, J. E., East-Palmer, J., Weintraub, B. D. & Szkludlinski, M. W. (1997). Expression of biologically active human thyrotropin (hTSH) in a baculovirus system: effect of insect cell glycosylation on hTSH activity in vitro and in vivo. *Endocrinology* **138**(1), 92-100.
- Gunne, H. & Steiner, H. (1993). Efficient secretion of attacin from insect fat-body cells requires proper processing of the prosequence. *Eur J Biochem* **214**(1), 287-93.
- Hanisch, F. G. (2001). O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem* **382**(2), 143-9.
- Hård, K., Van Doorn, J. M., Thomas-Oates, J. E., Kamerling, J. P. & 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**(3), 766-75.
- Hefferon, K. L., Oomens, A. G., Monsma, S. A., Finnerty, C. M. & Blissard, G. W. (1999). Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology* **258**(2), 455-68.
- Helenius, A. & Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**(5512), 2364-9.
- Hirschberg, C. B. & Snider, M. D. (1987). Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* **56**(5512), 63-87.
- Hollister, J. R. & Jarvis, D. L. (2001). Engineering lepidopteran insect cells for sialoglycoprotein production by genetic transformation with mammalian beta1,4-galactosyltransferase and alpha2,6-sialyltransferase genes. *Glycobiology* **11**(1), 1-9.

- Hollister, J. R., Shaper, J. H. & Jarvis, D. L. (1998). Stable expression of mammalian beta 1,4-galactosyltransferase extends the N-glycosylation pathway in insect cells. *Glycobiology* **8**(5), 473-80.
- Hooker, A. D., Green, N. H., Baines, A. J., Bull, A. T., Jenkins, N., Strange, P. G. & James, D. C. (1999). Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN-gamma in Chinese hamster ovary and insect cells. *Biotechnol Bioeng* **63**(5), 559-72.
- Hsieh, P. & Robbins, P. W. (1984). Regulation of asparagine-linked oligosaccharide processing. Oligosaccharide processing in *Aedes albopictus* mosquito cells. *J Biol Chem* **259**(4), 2375-82.
- Hsu, T. A., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Kato, K., Shimada, I., Masuda, K., Whiteley, E. M., Fan, J. Q., Lee, Y. C. & Betenbaugh, M. J. (1997). Differential N-glycan patterns of secreted and intracellular IgG produced in *Trichoplusia ni* cells. *J Biol Chem* **272**(14), 9062-70.
- Ito, Y. & Paulson, J. (1993). Combined use of trans-sialidase and sialyltransferase for enzymatic synthesis of α NeuAc2-3 β Gal-OR. *J Am Chem Soc* **115**, 1603-1605.
- Jarvis, D. L. (1993). Effects of baculovirus infection on IE1-mediated foreign gene expression in stably transformed insect cells. *J Virol* **67**(5), 2583-91.
- Jarvis, D. L. (1997). Baculovirus expression vectors. In *The baculoviruses* (Miller, L. K., ed.), pp. 389-431. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Jarvis, D. L., Bohlmeier, D. A., Liao, Y. F., Lomax, K. K., Merkle, R. K., Weinkauff, C. & Moremen, K. W. (1997). Isolation and characterization of a class II alpha-mannosidase cDNA from lepidopteran insect cells. *Glycobiology* **7**(1), 113-27.
- Jarvis, D. L. & Finn, E. E. (1996). Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. *Nat Biotechnol* **14**(10), 1288-92.
- Jarvis, D. L. & Garcia, A., Jr. (1994). Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein. *Virology* **205**(1), 300-13.
- Jarvis, D. L. & Guarino, L. A. (1995). Continuous foreign gene expression in transformed lepidopteran insect cells. *Methods Mol Biol* **39**, 187-202.
- Jarvis, D. L., Howe, D. & Aumiller, J. J. (2001). Novel baculovirus expression vectors that provide sialylation of recombinant glycoproteins in lepidopteran insect cells. *J Virol* **75**(13), 6223-7.
- Jarvis, D. L., Kowar, Z. S. & Hollister, J. R. (1998). Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. *Curr Opin Biotechnol* **9**(5), 528-33.
- Jarvis, D. L., Oker-Blom, C. & 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**(4), 181-91.
- Jarvis, D. L., Summers, M. D., Garcia, A., Jr. & Bohlmeier, D. A. (1993). Influence of different signal peptides and prosequences on expression and secretion of human tissue plasminogen activator in the baculovirus system. *J Biol Chem* **268**(22), 16754-62.
- Jarvis, D. L., Weinkauff, C. & Guarino, L. A. (1996). Immediate-early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells. *Protein Expr Purif* **8**(2), 191-203.
- Jenkins, N. (1995). Monitoring and control of recombinant glycoprotein heterogeneity in animal cell cultures. *Biochem Soc Trans* **23**(1), 171-5.
- Jenkins, N., Parekh, R. B. & James, D. C. (1996). Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol* **14**(8), 975-81.

- Joshi, L., Davis, T. R., Mattu, T. S., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Shuler, M. L. & Wood, H. A. (2000). Influence of baculovirus-host cell interactions on complex N-linked glycosylation of a recombinant human protein. *Biotechnol Prog* **16**(4), 650-6.
- Julien, M., Verrier, B., Cerutti, M., Chappe, V., Gola, M., Devauchelle, G. & Becq, F. (1999). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) confers glibenclamide sensitivity to outwardly rectifying chloride channel (ORCC) in Hi-5 insect cells. *J Membr Biol* **168**(3), 229-39.
- Karaçali, S., Deveci, R., Pehlivan, S. & Ozcan, A. (2000). Adhesion of hemocytes to desialylated prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) in the larval stage. *Invert. Reprod. and Dev.* **37**(2), 167-170.
- Karaçali, S., Kirmizigül, S. & Deveci, R. (1999). Sialic acids in developing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Invert. Reprod. and Dev.* **35**(3), 225-229.
- Karaçali, S., Kirmizigül, S., Deveci, R., Deveci, O., Onat, T. & Gürcü, B. (1997). Presence of sialic acids in prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Tissue & Cell* **29**(3), 315-321.
- Kawar, Z., Herscovics, A. & Jarvis, D. L. (1997). Isolation and characterization of an alpha 1,2-mannosidase cDNA from the lepidopteran insect cell line Sf9. *Glycobiology* **7**(3), 433-43.
- Kawar, Z. & Jarvis, D. L. (2001). Biosynthesis and subcellular localization of a lepidopteran insect alpha 1,2-mannosidase. *Insect Biochem Mol Biol* **31**(4-5), 289-97.
- Kawar, Z., Karaveg, K., Moremen, K. W. & Jarvis, D. L. (2001). Insect Cells Encode a Class II alpha -Mannosidase with Unique Properties. *J Biol Chem* **276**(19), 16335-40.
- Kawar, Z., Romero, P. A., Herscovics, A. & Jarvis, D. L. (2000). N-Glycan processing by a lepidopteran insect alpha 1,2-mannosidase. *Glycobiology* **10**(4), 347-55.
- Kean, E. L. (1991). Sialic acid activation. *Glycobiology* **1**(5), 441-7.
- Kedees, M. H., Gerold, P., Azzouz, N., Blaschke, T., Shams-Eldin, H., Muhlberger, E., Holder, A. A., Klenk, H. D., Schwarz, R. T. & Eckert, V. (2000). Processing and localisation of a GPI-anchored Plasmodium falciparum surface protein expressed by the baculovirus system. *Eur J Cell Biol* **79**(1), 52-61.
- Keefer, M. C., Graham, B. S., Belshe, R. B., Schwartz, D., Corey, L., Bolognesi, D. P., Stablein, D. M., Montefiori, D. C., McElrath, M. J., Clements, M. L. & et al. (1994). Studies of high doses of a human immunodeficiency virus type 1 recombinant glycoprotein 160 candidate vaccine in HIV type 1- seronegative humans. The AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**(12), 1713-23.
- Kingsley, D. H., Behbahani, A., Rashtian, A., Blissard, G. W. & Zimmerberg, J. (1999). A discrete stage of baculovirus GP64-mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell* **10**(12), 4191-200.
- Kishimoto, T., Watanabe, M., Mitsui, T. & Hori, H. (1999). Glutelin basic subunits have a mammalian mucin-type O-linked disaccharide side chain. *Arch Biochem Biophys* **370**(2), 271-7.
- Kleene, R. & Berger, E. G. (1993). The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta* **1154**(3-4), 283-325.
- Klein, A. & Roussel, P. (1998). O-acetylation of sialic acids. *Biochimie* **80**(1), 49-57.
- Klenk, H. D. (1996). Post-translational modifications in insect cells. *Cytotechnology* **20**, 139-144.
- Kobata, A. Principles of Glycobiology. In *Glycoproteins and Biology* (Glyko Tools for Glycobiology, catalogue 2001-2002), pp. 2-9. Glyko, Novato, CA.
- Kodukula, K., Gerber, L. D., Amthauer, R., Brink, L. & Udenfriend, S. (1993). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins in intact cells: specific

- amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and GPI attachment. *J Cell Biol* **120**(3), 657-64.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**(2), 631-64.
- Kretzchmar, E., Geyer, R. & Klenk, H. D. (1994). Baculovirus infection does not alter N-glycosylation in *Spodoptera frugiperda* cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* **375**(5), 23-7.
- Kubelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G. & Marz, 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**(1), 148-57.
- Kulakosky, P. C., Hughes, P. R. & Wood, H. A. (1998). N-Linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. *Glycobiology* **8**(7), 741-5.
- Lawrence, S. M., Huddleston, K. A., Pitts, L. R., Nguyen, N., Lee, Y. C., Vann, W. F., Coleman, T. A. & Betenbaugh, M. J. (2000). Cloning and expression of the human N-acetylneuraminic acid phosphate synthase gene with 2-keto-3-deoxy-D-glycero- D-galacto-nononic acid biosynthetic ability. *J Biol Chem* **275**(23), 17869-77.
- Lee, K. B. & Lee, Y. C. (1994). Transfer of modified sialic acids by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase for attachment of functional groups to oligosaccharide. *Anal Biochem* **216**(2), 358-64.
- Leguizamon, M. S., Campetella, O. E., Gonzalez Cappa, S. M. & Frasch, A. C. (1994). Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. *Infect Immun* **62**(8), 3441-6.
- Lehman, D. J., Roof, L. L., Brideau, R. J., Aeed, P. A., Thomsen, D. R., Elhammer, A. P., Wathen, M. W. & Homa, F. L. (1993). Comparison of soluble and secreted forms of human parainfluenza virus type 3 glycoproteins expressed from mammalian and insect cells as subunit vaccines. *J Gen Virol* **74**(Pt 3), 459-69.
- Lenhard, T. & Reilander, H. (1997). Engineering the folding pathway of insect cells: generation of a stably transformed insect cell line showing improved folding of a recombinant membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun* **238**(3), 823-30.
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A. C., Gomord, V. & Faye, L. (1998). N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol* **38**(1-2), 31-48.
- Licari, P. J., Jarvis, D. L. & Bailey, J. E. (1993). Insect cell hosts for baculovirus expression vectors contain endogenous exoglycosidase activity. *Biotechnol Prog* **9**(2), 146-52.
- Loisel, T. P., Ansanay, H., St-Onge, S., Gay, B., Boulanger, P., Strosberg, A. D., Marullo, S. & Bouvier, M. (1997). Recovery of homogeneous and functional beta 2-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles. *Nat Biotechnol* **15**(12), 1300-4.
- Lopez, M., Coddeville, B., Langridge, J., Plancke, Y., Sautiere, P., Chaabihi, H., Chirat, F., Harduin-Lepers, A., Cerutti, M., Verbert, A. & Delannoy, P. (1997). Microheterogeneity of the oligosaccharides carried by the recombinant bovine lactoferrin expressed in *Mamestra brassicae* cells. *Glycobiology* **7**(5), 635-51.
- Lopez, M., Gazon, M., Juliant, S., Plancke, Y., Leroy, Y., Strecker, G., Cartron, J. P., Bailly, P., Cerutti, M., Verbert, A. & Delannoy, P. (1998). Characterization of a UDP-Gal:Galbeta1-3GalNAc alpha1, 4- galactosyltransferase activity in a *Mamestra brassicae* cell line. *J Biol Chem* **273**(50), 33644-51.

- Lopez, M., Tetaert, D., Juliant, S., Gazon, M., Cerutti, M., Verbert, A. & Delannoy, P. (1999). O-glycosylation potential of lepidopteran insect cell lines. *Biochim Biophys Acta* **1427**(1), 49-61.
- Lubineau, A., Basset-Carpentier, K. & Auge, C. (1997). Porcine liver (2-->3)-alpha-sialyltransferase: substrate specificity studies and application of the immobilized enzyme to the synthesis of various sialylated oligosaccharide sequences. *Carbohydr Res* **300**(2), 161-7.
- Luo, C., Thielens, N. M., Gagnon, J., Gal, P., Sarvari, M., Tseng, Y., Tosi, M., Zavodszky, P., Arlaud, G. J. & Schumaker, V. N. (1992). Recombinant human complement subcomponent C1s lacking beta-hydroxyasparagine, sialic acid, and one of its two carbohydrate chains still reassembles with C1q and C1r to form a functional C1 complex. *Biochemistry* **31**(17), 4254-62.
- Luo, K., McLachlin, J. R., Brown, M. R. & Adang, M. J. (1999). Expression of a glycosylphosphatidylinositol-linked *Manduca sexta* aminopeptidase N in insect cells. *Protein Expr Purif* **17**(1), 113-22.
- Malissard, M., Zeng, S. & Berger, E. G. (1999). The yeast expression system for recombinant glycosyltransferases. *Glycoconj J* **16**(2), 125-39.
- Malykh, Y. N., Krisch, B., Gerardy-Schahn, R., Lapina, E. B., Shaw, L. & Schauer, R. (1999). The presence of N-acetylneuraminic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*. *Glycoconj J* **16**(11), 731-9.
- Manneberg, M., Friedlein, A., Kurth, H., Lahm, H. W. & Fountoulakis, M. (1994). Structural analysis and localization of the carbohydrate moieties of a soluble human interferon gamma receptor produced in baculovirus-infected insect cells. *Protein Sci* **3**(1), 30-8.
- Maras, M., van Die, I., Contreras, R. & van den Hondel, C. A. (1999). Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycoconj J* **16**(2), 99-107.
- Marquardt, T. & Freeze, H. (2001). Congenital disorders of glycosylation: glycosylation defects in man and biological models for their study. *Biol Chem* **382**(2), 161-77.
- März, L., Altmann, F., Staudacher, E. & Kubelka, V. (1995). Protein glycosylation in insects. In *Glycoproteins - New comprehensive biochemistry* (Montreuil, J., Vliegthart, J. F. G. & Schachter, H., eds.), Vol. 29a, pp. 163-172. Elsevier Science, Amsterdam.
- Miller, L. K. (1988). Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu Rev Microbiol* **42**(9), 177-99.
- Munro, K. I., Wellington, J. E., Love, D. N. & Whalley, J. M. (1999). Characteristics of glycoprotein B of equine herpesvirus 1 expressed by a recombinant baculovirus. *Vet Microbiol* **68**(1-2), 49-57.
- Munster, A. K., Eckhardt, M., Potvin, B., Muhlenhoff, M., Stanley, P. & Gerardy-Schahn, R. (1998). Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16), 9140-5.
- Nagarajan, S. & Selvaraj, P. (1999). Expression and characterization of glycolipid-anchored B7-1 (CD80) from baculovirus-infected insect cells: protein transfer onto tumor cells. *Protein Expr Purif* **17**(2), 273-81.
- Noguchi, A., Mukuria, C. J., Suzuki, E. & Naiki, M. (1995). Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biochem (Tokyo)* **117**(1), 59-62.

- Ogonah, O. W., Freedman, R. B., Jenkins, N., Patel, K. & 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.
- Oomens, A. G. & Blissard, G. W. (1999). Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* **254**(2), 297-314.
- Oomens, A. G., Monsma, S. A. & Blissard, G. W. (1995). The baculovirus GP64 envelope fusion protein: synthesis, oligomerization, and processing. *Virology* **209**(2), 592-603.
- Opat, A. S., Houghton, F. & Gleeson, P. A. (2000). Medial Golgi but not late Golgi glycosyltransferases exist as high molecular weight complexes. Role of luminal domain in complex formation and localization. *J Biol Chem* **275**(16), 11836-45.
- O'Reilly, D. R. & Miller, L. K. (1989). A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* **245**(4922), 1110-2.
- Oriol, R. (1995). ABO, Hh, Lewis and secretion. Serology, genetics and tissue distribution. In *Molecular basis of major blood group antigens* (Cartron, J. P. & Rouger, P., eds.), Vol. 6, pp. 37-73. Plenum Press, London.
- Oriol, R., Candelier, J. J., Taniguchi, S., Balanzino, L., Peters, L., Niekrasz, M., Hammer, C. & Cooper, D. K. (1999). Major carbohydrate epitopes in tissues of domestic and African wild animals of potential interest for xenotransplantation research. *Xenotransplantation* **6**(2), 79-89.
- Pajot-Augy, E., Bozon, V., Remy, J. J., Couture, L. & Salesse, R. (1999). Critical relationship between glycosylation of recombinant lutropin receptor ectodomain and its secretion from baculovirus-infected insect cells. *Eur J Biochem* **260**(3), 635-48.
- Pan, Y. T., Hori, H., Saul, R., Sanford, B. A., Molyneux, R. J. & Elbein, A. D. (1983). Castanospermine inhibits the processing of the oligosaccharide portion of the influenza viral hemagglutinin. *Biochemistry* **22**(16), 3975-84.
- Park, Y. I., Wood, H. A. & Lee, Y. C. (1999). Monosaccharide compositions of *Danaus plexippus* (monarch butterfly) and *Trichoplusia ni* (cabbage looper) egg glycoproteins. *Glycoconj J* **16**(10), 629-38.
- Parker, G. F., Williams, P. J., Butters, T. D. & Roberts, D. B. (1991). Detection of the lipid-linked precursor oligosaccharide of N-linked protein glycosylation in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* **290**(1-2), 58-60.
- Parodi, A. J., Pollevick, G. D., Mautner, M., Buschiazzi, A., Sanchez, D. O. & Frasch, A. C. (1992). Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *Embo J* **11**(5), 1705-10.
- Pereira, M. E. (1983). A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Science* **219**(4591), 1444-6.
- Pereira, M. E., Mejia, J. S., Ortega-Barria, E., Matzilevich, D. & Prioli, R. P. (1991). The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. *J Exp Med* **174**(1), 179-91.
- Pereira-Chioccola, V. L. & Schenkman, S. (1999). Biological role of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Biochem Soc Trans* **27**(4), 516-8.
- Pfannschmidt, G. & Schauer, R. (1980). The role of membrane sialyl and galactosyl residues in regulation of the life-time of rabbit erythrocytes. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **361**(11), 1683-95.
- Pines, O. & Inouye, M. (1999). Expression and secretion of proteins in *E. coli*. *Mol Biotechnol* **12**(1), 25-34.

- Piras, M. M., Henriquez, D. & Piras, R. (1987). The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the in vitro penetration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes into fibroblastic cells. *Mol Biochem Parasitol* **22**(2-3), 135-43.
- Possee, R. D. (1997). Baculoviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* **8**(5), 569-72.
- Previato, J. O., Andrade, A. F., Pessolani, M. C. & Mendonca-Previato, L. (1985). Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol Biochem Parasitol* **16**(1), 85-96.
- Quesada Allue, L. A. & Belocopitow, E. (1978). Lipid-bound oligosaccharides in insects. *Eur J Biochem* **88**(2), 529-41.
- Ren, J., Bretthauer, R. K. & Castellino, F. J. (1995). Purification and properties of a Golgi-derived (alpha 1,2)-mannosidase- I from baculovirus-infected lepidopteran insect cells (IPLB-SF21AE) with preferential activity toward mannose6-N-acetylglucosamine2. *Biochemistry* **34**(8), 2489-95.
- Ren, J., Castellino, F. J. & Bretthauer, R. K. (1997). Purification and properties of alpha-mannosidase II from Golgi-like membranes of baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE) cells. *Biochem J* **324**(Pt 3), 951-6.
- Reyes-Leyva, J., Espinosa, B., Santos, G., Zenteno, R., Hernandez, J., Vallejo, V. & Zenteno, E. (1999). Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconj J* **16**(9), 517-22.
- Ribeirao, M., Pereira-Chioccola, V. L., Eichinger, D., Rodrigues, M. M. & Schenkman, S. (1997). Temperature differences for trans-glycosylation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Glycobiology* **7**(8), 1237-46.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R. & Gehring, W. J. (1992). Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* **256**(5057), 673-5.
- Rudd, P. M., Downing, A. K., Cadene, M., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Weir, I., Dwek, R. A., Rifkin, D. B. & Gleizes, P. E. (2000). Hybrid and complex glycans are linked to the conserved N-glycosylation site of the third eight-cysteine domain of LTBP-1 in insect cells. *Biochemistry* **39**(7), 1596-603.
- Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A. & Dwek, R. A. (2001). Glycosylation and the immune system. *Science* **291**(5512), 2370-6.
- Russo, S., Montermini, L., Berkovitz-Siman-Tov, R., Ponti, W. & Poli, G. (1998). Expression of bovine leukemia virus ENV glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus. *FEBS Lett* **436**(1), 11-6.
- Sagami, H. & Lennarz, W. J. (1987). Glycoprotein synthesis in *Drosophila* Kc cells. Biosynthesis of dolichol-linked saccharides. *J Biol Chem* **262**(32), 15610-7.
- Salmon, V., Legrand, D., Georges, B., Slomianny, M. C., Coddeville, B. & Spik, G. (1997). Characterization of human lactoferrin produced in the baculovirus expression system. *Protein Expr Purif* **9**(2), 203-10.
- Samanci, A., Yi, Q., Fagerberg, J., Strigard, K., Smith, G., Ruden, U., Wahren, B. & Mellstedt, H. (1998). Pharmacological administration of granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor is of significant importance for the induction of a strong humoral and cellular response in patients immunized with recombinant carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol Immunother* **47**(3), 131-42.
- Schachter, H. (1991). The 'yellow brick road' to branched complex N-glycans. *Glycobiology* **1**(5), 453-61.

- Schachter, H. (2000). Branching of N-glycans: N-Acetylglucosaminyltransferases. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part I* (Ernst, B., Hart, G. W. & Sinay, P., eds.), Vol. 2, pp. 145-173. Wiley-VCH, Weinheim.
- Schauer, R. (2000). Biochemistry of Sialic Acid Diversity. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology. Part II: Biology of Saccharides* (Ernst, B., Hart, G. W. & Sinay, P., eds.), Vol. 3, pp. 227-243. Wiley-VCH, Weinheim.
- Schauer, R. & Kamerling, J. P. (1997). Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. In *Glycoproteins II* (Montreuil, J., Vliegthart, J. F. G. & Schachter, H., eds.), pp. 243-402. Elsevier Science, Amsterdam.
- Schauer, R., Reuter, G., Muhlpfordt, H., Andrade, A. F. & Pereira, M. E. (1983). The occurrence of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **364**(8), 1053-7.
- Schenkman, S., Chaves, L. B., Pontes de Carvalho, L. C. & Eichinger, D. (1994a). A proteolytic fragment of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase lacking the carboxyl-terminal domain is active, monomeric, and generates antibodies that inhibit enzymatic activity. *J Biol Chem* **269**(11), 7970-5.
- Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M. E. & Nussenzweig, V. (1994b). Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol* **48**, 499-523.
- Schenkman, S., Ferguson, M. A., Heise, N., de Almeida, M. L., Mortara, R. A. & Yoshida, N. (1993). Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **59**(2), 293-303.
- Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W. & Nussenzweig, V. (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* **65**(7), 1117-25.
- Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L. & Nussenzweig, V. (1992). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J Exp Med* **175**(2), 567-75.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**(6779), 770-4.
- Scudder, P., Doom, J. P., Chuenkova, M., Manger, I. D. & Pereira, M. E. (1993). Enzymatic characterization of beta-D-galactoside alpha 2,3-trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **268**(13), 9886-91.
- Seppo, A. & Tiemeyer, M. (2000). Function and structure of *Drosophila* glycans. *Glycobiology* **10**(8), 751-60.
- Sharon, N. (1975). *Complex Carbohydrates - Their Chemistry, Biochemistry and Functions*, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, MA.
- Shaw, L. & Schauer, R. (1988). The biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid. *Biol Chem Hoppe Seyler* **369**(6), 477-86.
- Shi, Y. P., Das, P., Holloway, B., Udhayakumar, V., Tongren, J. E., Candal, F., Biswas, S., Ahmad, R., Hasnain, S. E. & Lal, A. A. (2000). Development, expression, and murine testing of a multistage *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate. *Vaccine* **18**(25), 2902-14.
- Shinkai, A., Shinoda, K., Sasaki, K., Morishita, Y., Nishi, T., Matsuda, Y., Takahashi, I. & Anazawa, H. (1997). High-level expression and purification of a recombinant human

- alpha-1, 3-fucosyltransferase in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* **10**(3), 379-85.
- Smith, G. E., Summers, M. D. & Fraser, M. J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* **3**(12), 2156-65.
- Smith, L. E. & Eichinger, D. (1997). Directed mutagenesis of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enzyme identifies two domains involved in its sialyltransferase activity. *Glycobiology* **7**(3), 445-51.
- Sridhar, P. & Hasnain, S. E. (1993). Differential secretion and glycosylation of recombinant human chorionic gonadotropin (beta hCG) synthesized using different promoters in the baculovirus expression vector system. *Gene* **131**(2), 261-4.
- Stanley, P. (1992). Glycosylation engineering. *Glycobiology* **2**(2), 99-107.
- Staudacher, E., Altmann, F., Marz, L., Hard, K., Kamerling, J. P. & Vliegenthart, J. F. (1992a). Alpha 1-6(alpha 1-3)-difucosylation of the asparagine-bound N-acetylglucosamine in honeybee venom phospholipase A2. *Glycoconj J* **9**(2), 82-5.
- Staudacher, E., Kubelka, V. & Marz, L. (1992b). Distinct N-glycan fucosylation potentials of three lepidopteran cell lines. *Eur J Biochem* **207**(3), 987-93.
- Sugiyama, K., Ahorn, H., Maurer-Fogy, I. & Voss, T. (1993). Expression of human interferon-alpha 2 in Sf9 cells. Characterization of O-linked glycosylation and protein heterogeneities. *Eur J Biochem* **217**(3), 921-7.
- Summers, M. D. & Smith, G. E. (1987). A manual of methods for baculovirus and insect cell culture procedures. *Texas Agricultural Experiment State Bulletin* **1555**, 1-57.
- Swayne, D. E., Perdue, M. L., Beck, J. R., Garcia, M. & Suarez, D. L. (2000). Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years. *Vet Microbiol* **74**(1-2), 165-72.
- Tartakoff, A., Vassalli, P. & Detraz, M. (1978). Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. *J Cell Biol* **79**(3), 694-707.
- Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Khouri, H. E., Laliberte, F. & Vernet, T. (1991). Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* **98**(2), 177-83.
- Thomsen, D. R., Meyer, A. L. & Post, L. E. (1993). Applications of insect cell gene expression in pharmaceutical research. *Bioprocess Technol* **17**, 105-38.
- Thomsen, D. R., Post, L. E. & Elhammer, A. P. (1990). Structure of O-glycosidically linked oligosaccharides synthesized by the insect cell line Sf9. *J Cell Biochem* **43**(1), 67-79.
- Tomiya, N., Ailor, E., Lawrence, S. M., Betenbaugh, M. J. & Lee, Y. C. (2001). Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosylation by high-performance anion-exchange chromatography: sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells. *Anal Biochem* **293**(1), 129-37.
- Tomlinson, S., Pontes de Carvalho, L., Vandekerckhove, F. & Nussenzweig, V. (1992). Resialylation of sialidase-treated sheep and human erythrocytes by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: restoration of complement resistance of desialylated sheep erythrocytes. *Glycobiology* **2**(6), 549-51.
- Tonetti, M., Sturla, L., Bisso, A., Zanardi, D., Benatti, U. & De Flora, A. (1998). The metabolism of 6-deoxyhexoses in bacterial and animal cells. *Biochimie* **80**(11), 923-31.
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N., Jr. & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* **645**(1), 63-70.
- Trombetta, E. S. & Helenius, A. (1998). Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol* **8**(5), 587-92.

- Tulsiani, D. R., Harris, T. M. & Touster, O. (1982). Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II. *J Biol Chem* **257**(14), 7936-9.
- van de Wiel, D. F., van Rijn, P. A., Meloen, R. H. & Moormann, R. J. (1998). High-level expression of biologically active recombinant bovine follicle stimulating hormone in a baculovirus system. *J Mol Endocrinol* **20**(1), 83-98.
- van den Eijnden, D. H. (2000). On the Origin of Oligosaccharide Species - Glycosyltransferases in Action. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part I* (Ernst, B., Hart, G. W. & Sinay, P., eds.), Vol. 2, pp. 589-624. Wiley-VCH, Weinheim.
- van Die, I., van Tetering, A., Bakker, H., van den Eijnden, D. H. & Joziassse, D. H. (1996). Glycosylation in lepidopteran insect cells: identification of a beta 1-->4-N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology* **6**(2), 157-64.
- van Oers, M. M., Thomas, A. A., Moormann, R. J. & Vlak, J. M. (2001). Secretory pathway limits the enhanced expression of classical swine fever virus E2 glycoprotein in insect cells. *J Biotechnol* **86**(1), 31-8.
- Vandekerckhove, F., Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L., Tomlinson, S., Kiso, M., Yoshida, M., Hasegawa, A. & Nussenzweig, V. (1992). Substrate specificity of the Trypanosoma cruzi trans-sialidase. *Glycobiology* **2**(6), 541-8.
- Vandenbroeck, K., Willems, L., Billiau, A., Opendakker, G. & Huybrechts, R. (1994). Glycoform heterogeneity of porcine interferon-gamma expressed in Sf9 cells. *Lymphokine Cytokine Res* **13**(4), 253-8.
- Varki, A. (1992). Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins. *Curr Opin Cell Biol* **4**(2), 257-66.
- Varki, A. (1997). Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *Faseb J* **11**(4), 248-55.
- Velardo, M. A., Bretthauer, R. K., Boutaud, A., Reinhold, B., Reinhold, V. N. & Castellino, F. J. (1993). The presence of UDP-N-acetylglucosamine:alpha-3-D-mannoside beta 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**(24), 17902-7.
- Verbert, A. & Cacan, R. (1999). Trafficking of oligomannosides released during N-glycosylation: a clearing mechanism of the rough endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1473**(1), 137-46.
- Vetere, A. & Paoletti, S. (1996). Complete synthesis of 3'-sialyl-N-acetylglucosamine by regioselective transglycosylation. *FEBS Lett* **399**(3), 203-6.
- Vitale, A. & Chrispeels, M. J. (1984). Transient N-acetylglucosamine in the biosynthesis of phytohemagglutinin: attachment in the Golgi apparatus and removal in protein bodies. *J Cell Biol* **99**(1 Pt 1), 133-40.
- Volkman, L. E., Goldsmitn, P. A., Hess, R. T. & Faulkner, P. (1984). Neutralization of budded Autographa californica NPV by a monoclonal antibody: identification of the target antigen. *Virology* **133**, 354-362.
- Voss, T., Ergulen, E., Ahorn, H., Kubelka, V., Sugiyama, K., Maurer-Fogy, I. & Glossl, J. (1993). Expression of human interferon omega 1 in Sf9 cells. No evidence for complex-type N-linked glycosylation or sialylation. *Eur J Biochem* **217**(3), 913-9.
- Wagner, R., Geyer, H., Geyer, R. & Klenk, H. D. (1996a). N-acetyl-beta-glucosaminidase accounts for differences in glycosylation of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells from a baculovirus vector. *J Virol* **70**(6), 4103-9.

- Wagner, R., Liedtke, S., Kretzschmar, E., Geyer, H., Geyer, R. & Klenk, H. D. (1996b). Elongation of the N-glycans of fowl plague virus hemagglutinin expressed in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells by coexpression of human beta 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I. *Glycobiology* **6**(2), 165-75.
- Walmsley, A. M. & Arntzen, C. J. (2000). Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol* **11**(2), 126-9.
- Walsh, F. S. & Doherty, P. (1996). Cell adhesion molecules and neuronal regeneration. *Curr Opin Cell Biol* **8**(5), 707-13.
- Walsh, G. (2000). Biopharmaceutical benchmarks. *Nat Biotechnol* **18**(8), 831-3.
- Warner, T. G. (1999). Enhancing therapeutic glycoprotein production in Chinese hamster ovary cells by metabolic engineering endogenous gene control with antisense DNA and gene targeting. *Glycobiology* **9**(9), 841-50.
- Warren, L. (1963). The distribution of sialic acids in nature. *Comp Biochem Physiol* **10**, 153-171.
- Wathen, M. W., Aeed, P. A. & Elhammer, A. P. (1991). Characterization of oligosaccharide structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein expressed in insect cell line Sf9. *Biochemistry* **30**(11), 2863-8.
- Wells, L., Vosseller, K. & Hart, G. W. (2001). Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* **291**(5512), 2376-8.
- Weske, B., Dennis, R. D., Helling, F., Keller, M., Nores, G. A., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Dabrowski, U. & Wiegandt, H. (1990). Glycosphingolipids in insects. Chemical structures of two variants of a glucuronic-acid-containing ceramide hexasaccharide from a pupae of *Calliphora vicina* (Insecta: Diptera), distinguished by a N-acetylglucosamine-bound phosphoethanolamine sidechain. *Eur J Biochem* **191**(2), 379-88.
- Wester, L., Johansson, M. U. & Akerstrom, B. (1997). Physicochemical and biochemical characterization of human alpha 1-microglobulin expressed in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* **11**(1), 95-103.
- Whitford, M., Stewart, S., Kuzio, J. & Faulkner, P. (1989). Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *J Virol* **63**(3), 1393-9.
- Wolff, M. W., Murhammer, D. W., Jarvis, D. L. & Linhardt, R. J. (1999). Electrophoretic analysis of glycoprotein glycans produced by lepidopteran insect cells infected with an immediate early recombinant baculovirus encoding mammalian beta1,4-galactosyltransferase. *Glycoconj J* **16**(12), 753-6.
- Yamashita, K., Kamerling, J. P. & Kobata, A. (1983). Structural studies of the sugar chains of hen ovomucoid. Evidence indicating that they are formed mainly by the alternate biosynthetic pathway of asparagine-linked sugar chains. *J Biol Chem* **258**(5), 3099-106.
- Zanetta, J. P., Timmerman, P. & Leroy, Y. (1999). Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology* **9**(3), 255-66.
- Zingales, B., Carniol, C., de Lederkremer, R. M. & Colli, W. (1987). Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **26**(1-2), 135-44.

