



HAL
open science

Modification des capacités de glycosylation des cellules d'insectes

Ingrid Marchal

► **To cite this version:**

Ingrid Marchal. Modification des capacités de glycosylation des cellules d'insectes. Biochimie [q-bio.BM]. Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I, 2001. Français. NNT: . tel-00258437

HAL Id: tel-00258437

<https://theses.hal.science/tel-00258437>

Submitted on 22 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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 :

Résumé

L'utilisation thérapeutique de glycoprotéines recombinantes produites dans le système baculovirus-cellules d'insectes reste limitée par le potentiel de glycosylation de ces cellules, qui produisent essentiellement des structures *O*- et *N*-glycanniques courtes. Notre travail s'inscrit donc dans un effort global d'"humanisation" de la glycosylation des protéines produites dans les cellules de Lépidoptères.

Nous nous sommes d'abord attachés à comprendre la voie de maturation des *N*-glycannes dans des cellules Sf9. L'utilisation d'inhibiteurs de la maturation ou du trafic intracellulaire nous a permis d'identifier des intermédiaires clés et de confirmer l'hypothèse que la maturation des *N*-glycannes dans les cellules d'insectes et de mammifères suivent un chemin métabolique parallèle jusqu'à la formation de l'espèce GlcNAcMan₃[Fuc]GlcNAc₂. Chez les insectes, cette structure est ensuite substrat d'une β -*N*-acétylglucosaminidase qui produit l'espèce finale Man₃[Fuc]GlcNAc₂.

Cette voie de maturation peut néanmoins être déviée vers la synthèse de *N*-glycannes de type complexe par l'addition de glycosyltransférases absentes : ainsi, l'expression d'une β 1,4-galactosyltransférase permet la synthèse de l'espèce GalGlcNAcMan₃[Fuc]GlcNAc₂.

Notre intérêt s'est ensuite porté sur l'ingénierie de la sialylation dans les cellules d'insectes, compliquée par l'absence du donneur d'acides sialiques, le CMP-Neu5Ac. Notre stratégie a été d'exprimer la *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* sur la membrane plasmique des cellules, afin qu'elle puisse sialyler les glycoprotéines sécrétées en utilisant des donneurs du milieu. La construction exprimée grâce à un vecteur baculovirus code une enzyme active, dont une partie est retrouvée sur la membrane plasmique et sur l'enveloppe des particules virales, tandis qu'une partie, croissante avec l'infection, est soluble. Néanmoins, le système permet une sialylation quantitative d'accepteurs exogènes.

Notre étude contribue à montrer que l'ingénierie de la glycosylation dans le système baculovirus-cellules d'insectes est envisageable. Pour résoudre le problème de la sialylation, la *trans*-sialidase est une alternative possible aux sialyltransférases.

Modification of insect cell glycosylation

One limitation to the therapeutic use of insect cell-produced recombinant glycoproteins is their glycosylation potential which mainly leads to short *O*- and *N*-glycans. Thus, our work is part of a global effort to "humanize" the glycoproteins produced in Lepidopteran cells.

Our first concern was to understand the *N*-glycan processing pathway by metabolically labeling Sf9 cells. The use of processing inhibitors and of an intracellular trafficking inhibitor led us to the identification of key intermediates, thus confirming the hypothesis that the *N*-glycan processing pathway in insect cells parallels the one of mammalian cells up until the formation of the GlcNAcMan₃[Fuc]GlcNAc₂. In insects, this structure is the substrate for a β -N-acetylglucosaminidase, yielding Man₃[Fuc]GlcNAc₂.

Nonetheless, this processing pathway can be diverted to the synthesis of complex-type *N*-glycans by adding the lacking glycosyltransferases. As an example, the expression of a β 1,4-galactosyltransferase allows the formation of GalGlcNAcMan₃[Fuc]GlcNAc₂.

We were then interested in engineering the sialylation in insect cells, which is complicated by the lack of the sialic acid donor, CMP-Neu5Ac. Our strategy was to express *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase on the plasma membrane of insect cells, so that the enzyme can sialylate secreted glycoproteins, using sialylated donors from the medium. The construction was expressed by a baculovirus vector and found to encode an active enzyme which is partially located on the membrane and in the envelope of viral particles, while an increasing amount is soluble. However, the system can achieve the quantitative sialylation of exogenous acceptors.

Our study contributes to demonstrate that engineering the glycosylation pathways in insect cells can be considered. The *trans*-sialidase is a potential alternative to sialyltransferases to address the question of the sialylation.

"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 agréementé 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- <i>N</i> -acétylgalactosamine
GDP	guanidine diphosphate
Glc	D-glucose
GlcNAc	D- <i>N</i> -acétylglucosamine
GlcNAc-T ou GNT	D- <i>N</i> -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. <i>Introduction</i>	59
2. <i>Résultats</i>	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. <i>Discussion</i>	62
----------------------------	----

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

1. <i>Introduction</i>	66
2. <i>Résultats</i>	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. <i>Discussion</i>	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. <i>Introduction</i>	75
2. <i>Résultats</i>	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. <i>Discussion</i>	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 *séquon* 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.

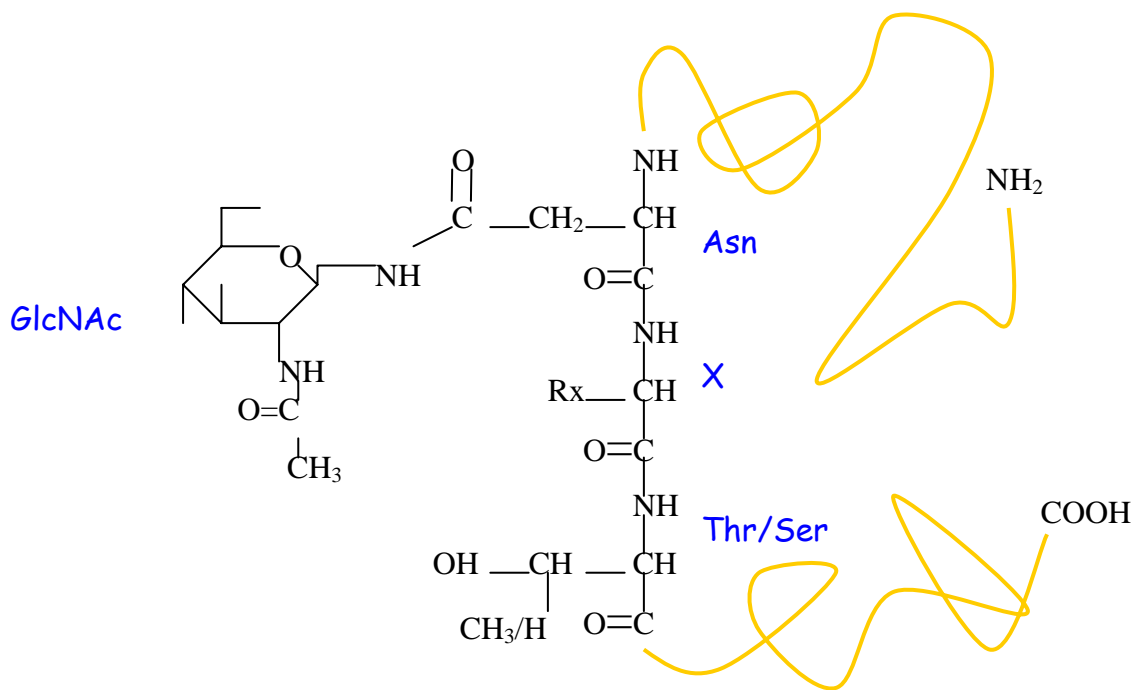
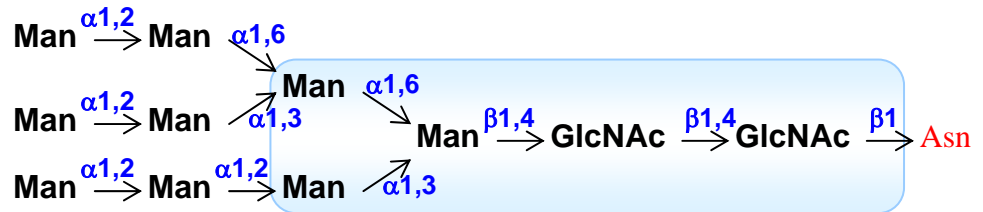


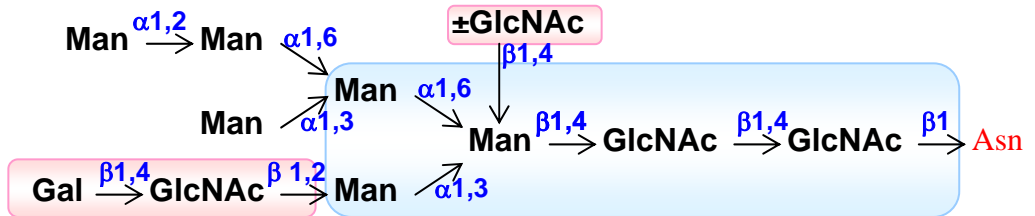
Figure 1 : liaison GlcNAc β 1Asn

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 glycanes de type oligomannosidique portent sur ce noyau des chaînes de mannose, alors que les glycanes 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 glycanes sont dits de type hybride quand l'une des branches est oligomannosidique et l'autre de type complexe.

Structure oligomannosidique



Structure hybride



Structure complexe

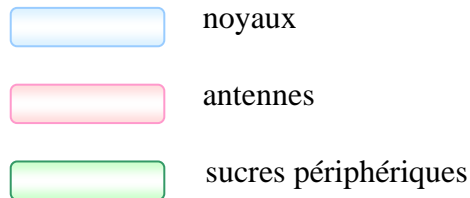
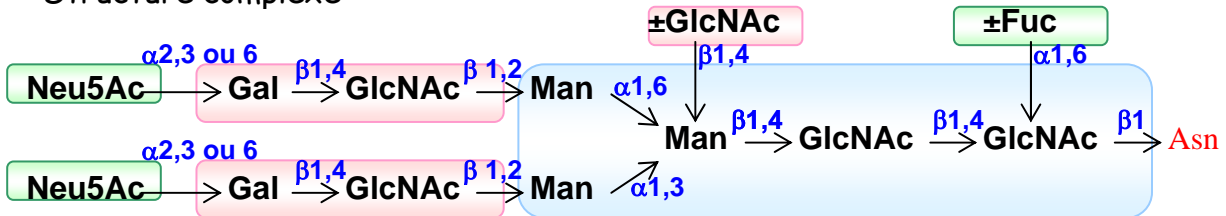


Figure 2 : Structures des trois grandes familles de N-glycannes

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.

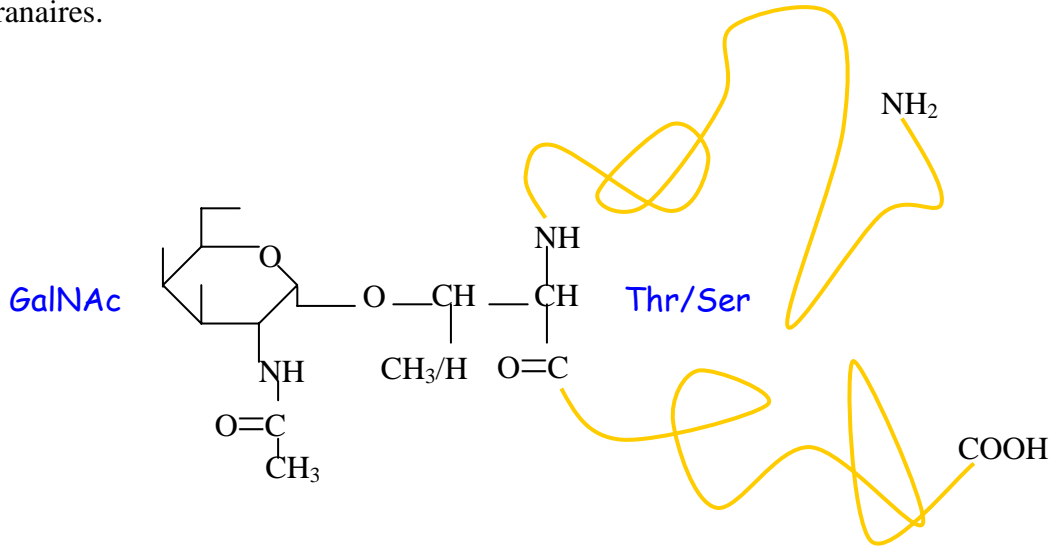


Figure 3 : Liaison GalNAc α 1Ser/Thr

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.

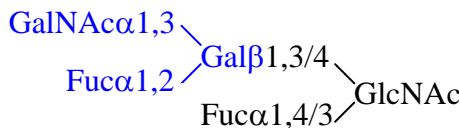
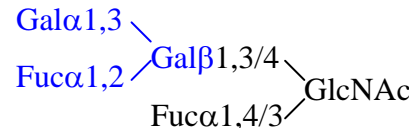
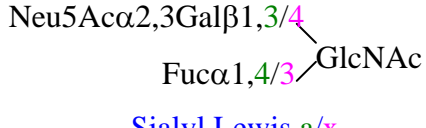
Périphérie	Squelette	Noyau	type
 Antigène A	Galβ1,3GlcNAcβ1,3 Type 1	Galβ1,3GalNAc	1
 Antigène B	Galβ1,4GlcNAcβ1,3 Type 2	GlcNAcβ1,6-GalNAc Galβ1,3	2
 Sialyl Lewis a/x	Galβ1,4GlcNAcβ1,6-Gal Galβ1,4GlcNAcβ1,3	GlcNAcβ1,3GalNAc	3
	Branchement	GlcNAcβ1,6-GalNAc GlcNAcβ1,3	4
		GalNAcα1,3GalNAc	5
		GlcNAcβ1,6GalNAc	6
		GalNAcα1,6GalNAc	7
		Galα1,3GalNAc	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).

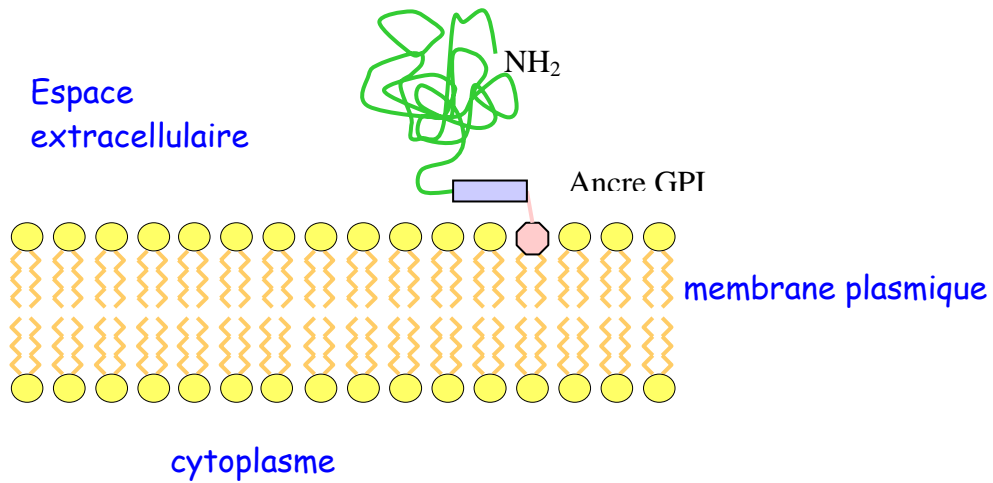


Figure 5 : Représentation schématique d'une protéine liée à la membrane plasmique par un ancrage GPI

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.

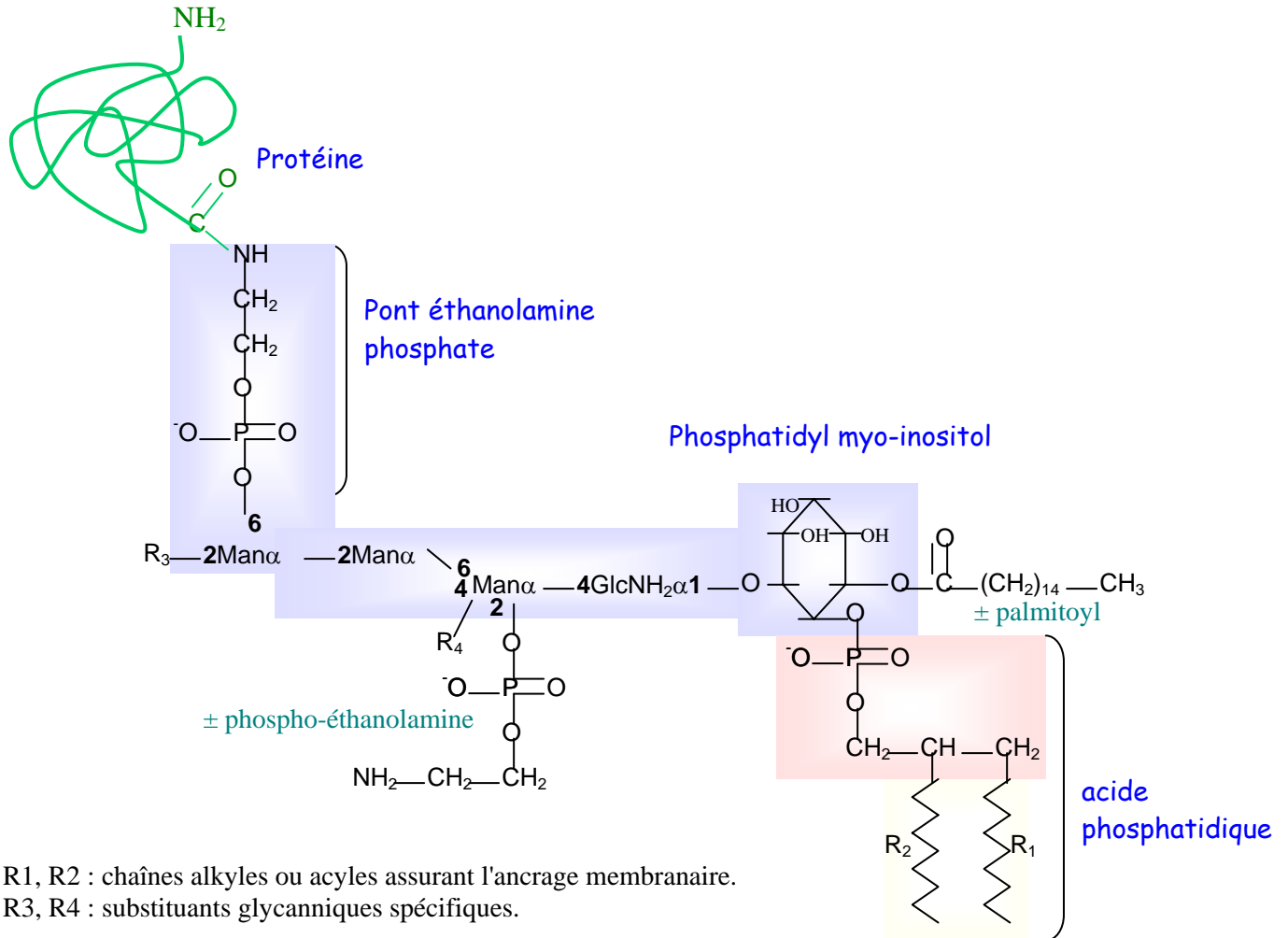


Figure 6 : Structure chimique d'une ancre GPI

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 glycannes 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 séryl ou thréonyl 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.

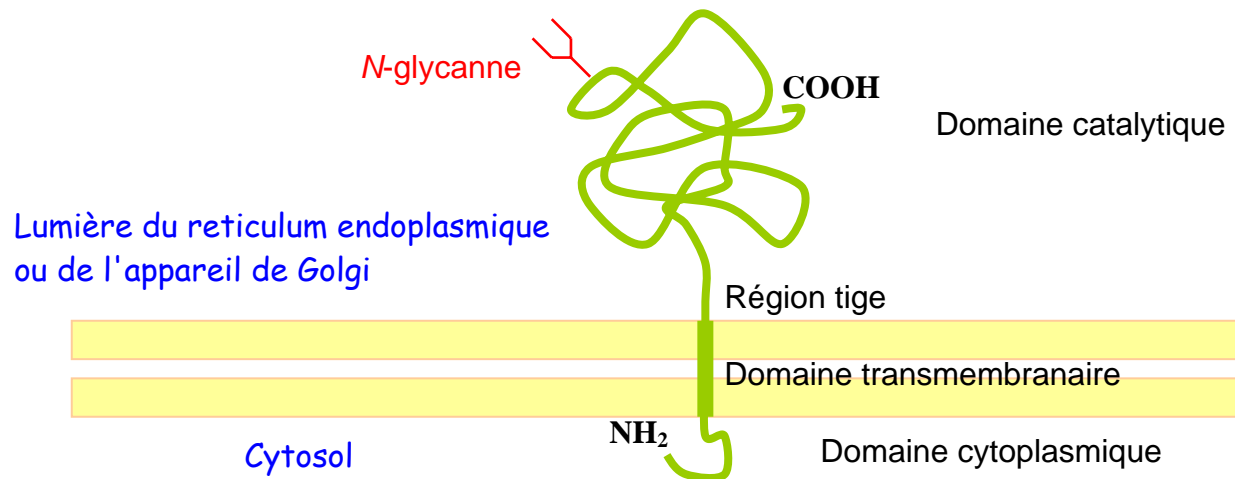


Figure 7 : Représentation schématique d'une glycosyltransférase

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 glycanniques 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 ancres 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.

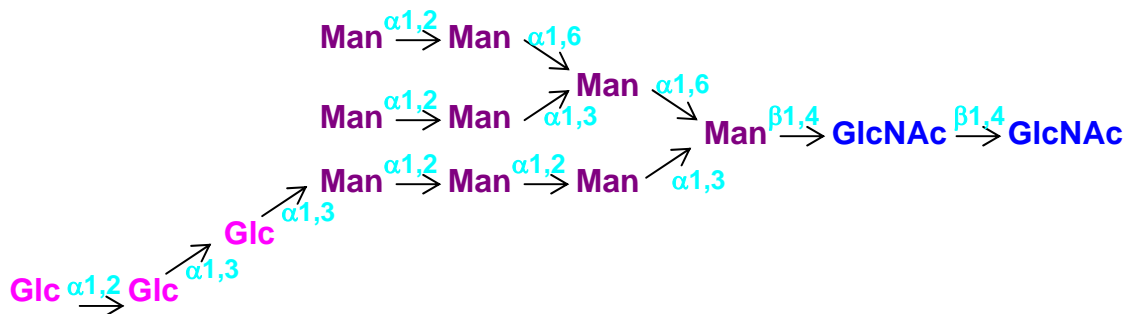


Figure 8 : Structure de l'oligosaccharide précurseur des *N*-glycannes

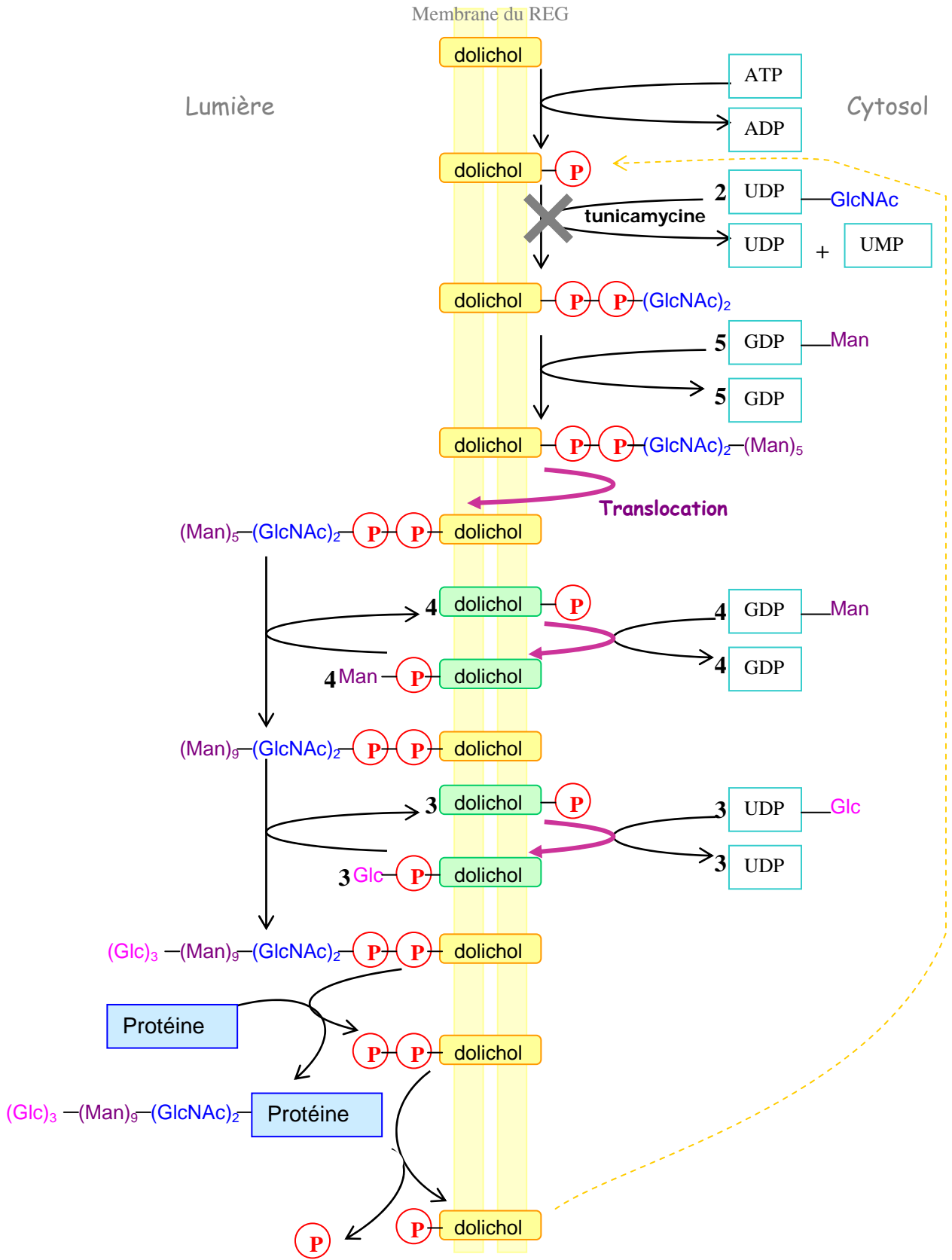


Figure 9 : Le cycle des dolichols

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'acquies 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).

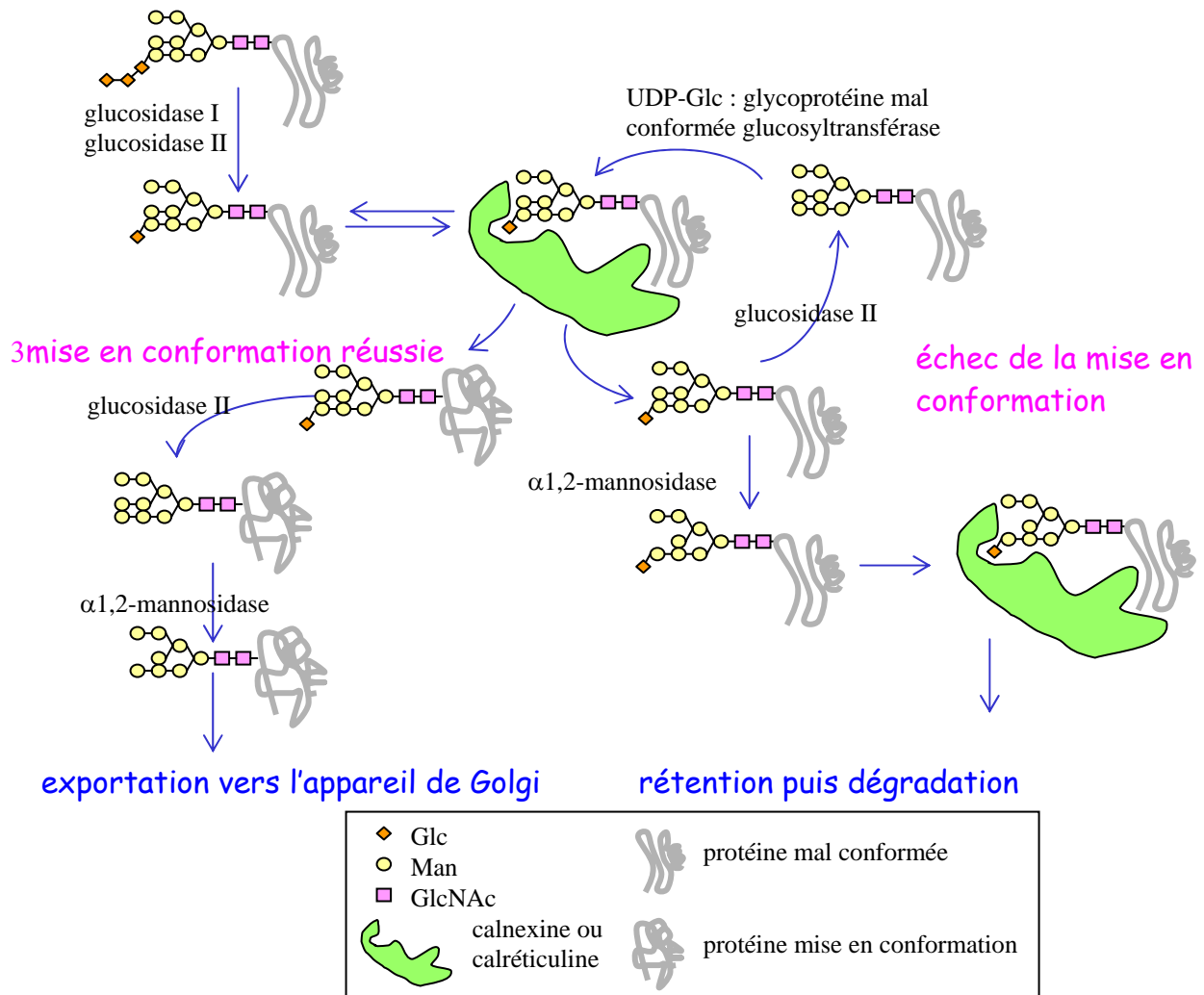


Figure 10 : Elagage et contrôle qualité des N-glycoprotéines dans le reticulum endoplasmique

3.2.2. Biosynthèse des ancrs 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).

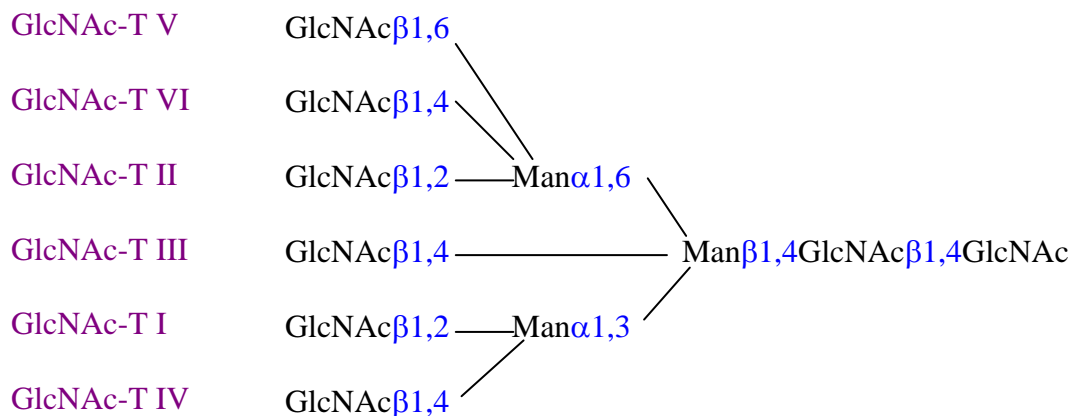


Figure 11 : Spécificité des différentes *N*-acétylglucosaminyltransférases impliquées dans la biosynthèse des *N*-glycannes

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.

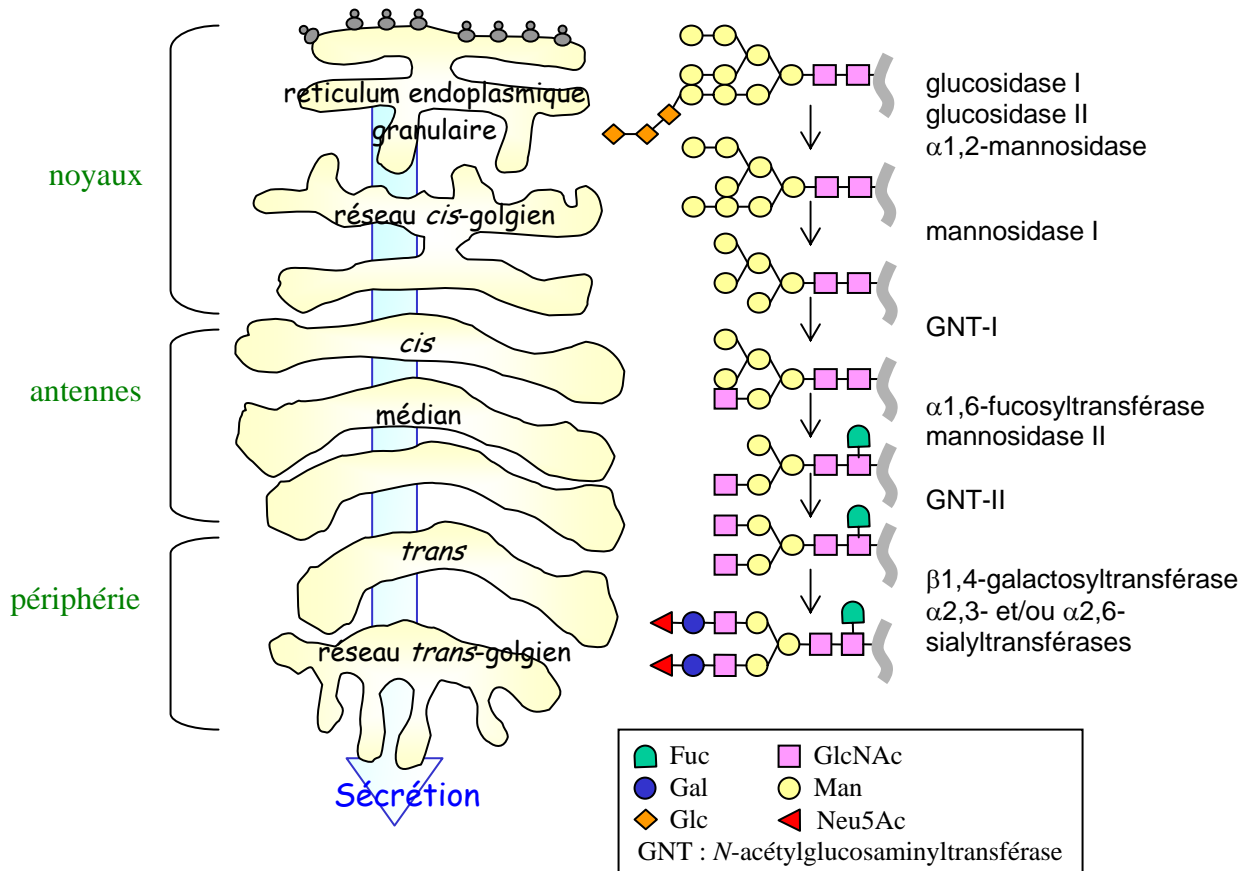


Figure 12 : Schéma de maturation des N-glycannes

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 glycanes 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-glycéro-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 hydroxyyles 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.

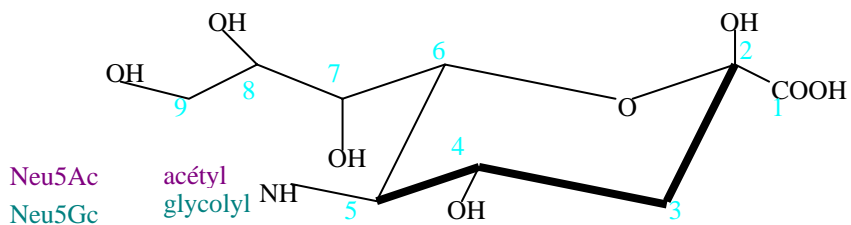


Figure 13 : Structure de base des acides sialiques

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 porcin (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 glycanes 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 granuleux (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).

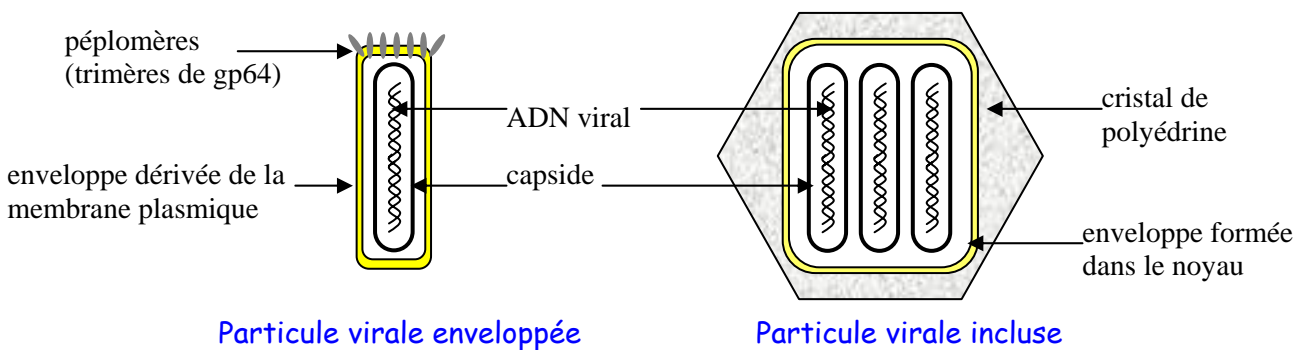


Figure 14 : Les deux formes du baculovirus

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).

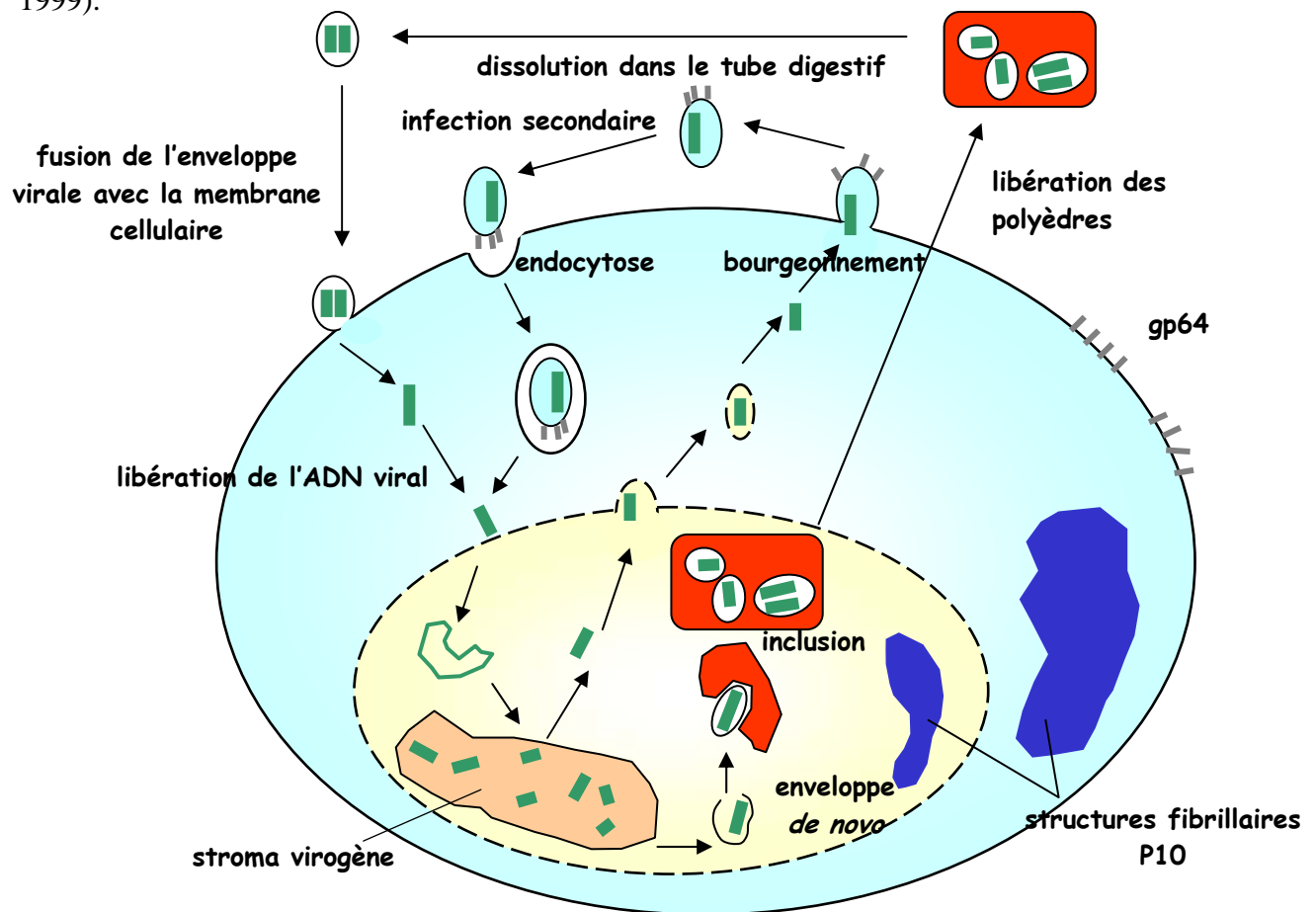


Figure 15 : Cycle infectieux du baculovirus

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 réplication 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 homologe 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 (Man_{6,9}GlcNAc₂), comme chez les mammifères, ou des glycannes tronqués, dits paucimannosidiques, de structure Man₃GlcNAc₂ ou même, plus rarement, Man₂GlcNAc₂. Ces dernières portent souvent sur le résidu GlcNAc d'attache du fucose en α 1,6 et chez certaines espèces, en α 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 α 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 glycanes oligomannosidiques portent le même type de glycanne sur la glycoprotéine recombinante, alors que les glycanes 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*-glycanes 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*-glycanes 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*-glycanes 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. acraea*, 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-éthanamine

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 ST6GalI) 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 glycanes 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 fétuine. 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).

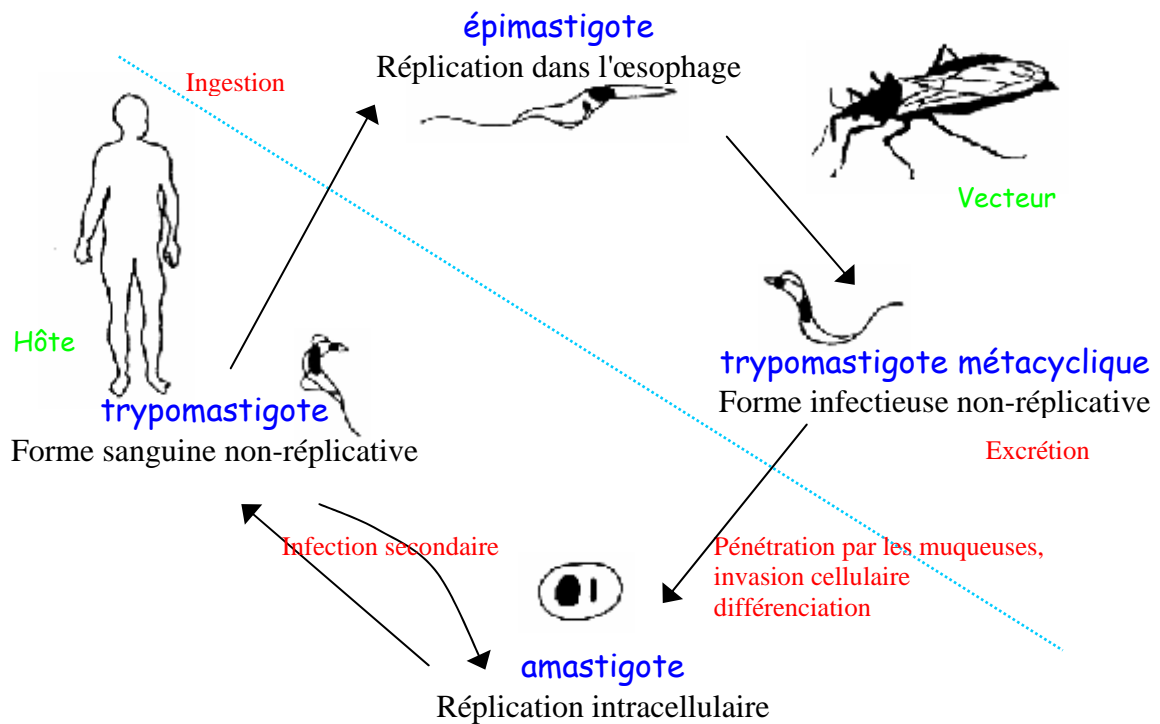


Figure 16 : Schéma du cycle de vie de *Trypanosoma cruzi* (d'après Cross et Takle, 1993).

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 pour 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 (Frevert *et al.*, 1992). Seule la partie N-terminale est catalytique, la digestion par la papaine 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).

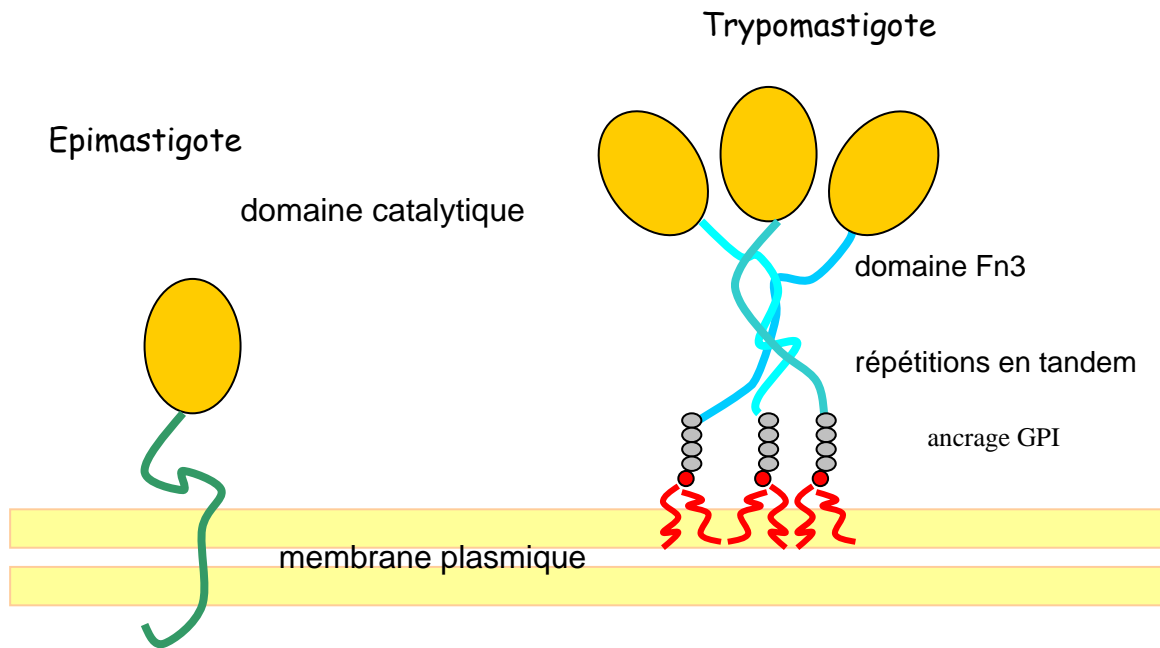


Figure 17 : Structure schématique des formes de *trans-sialidase* exprimées aux stades épimastigote et trypomastigote (d'après une revue de Schenkman *et al.*, 1994b).

2.3. Activité catalytique de la *trans-sialidase*

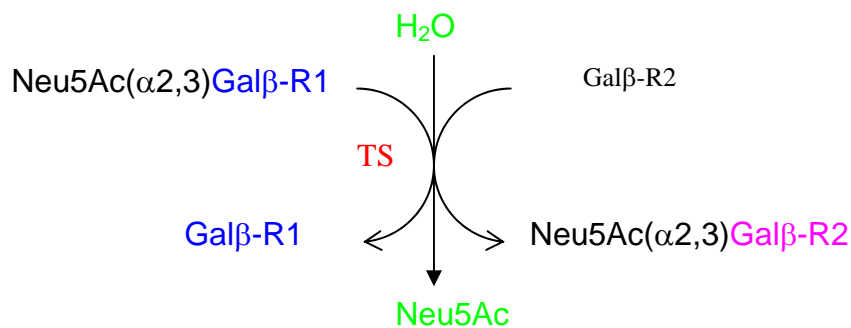


Figure 18 : Schéma général des réactions catalysées par la *trans-sialidase* de *Trypanosoma cruzi*

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 trypanostigotes. 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 trypanostigotes 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 trypanostigotes 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 $\alpha 1,3$ 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 sialyler *in vitro* les glycoprotéines purifiées à l'aide d'une sialyltransférase et de CMP-NeuAc, 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 sialyler 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 sialyler 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.

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.

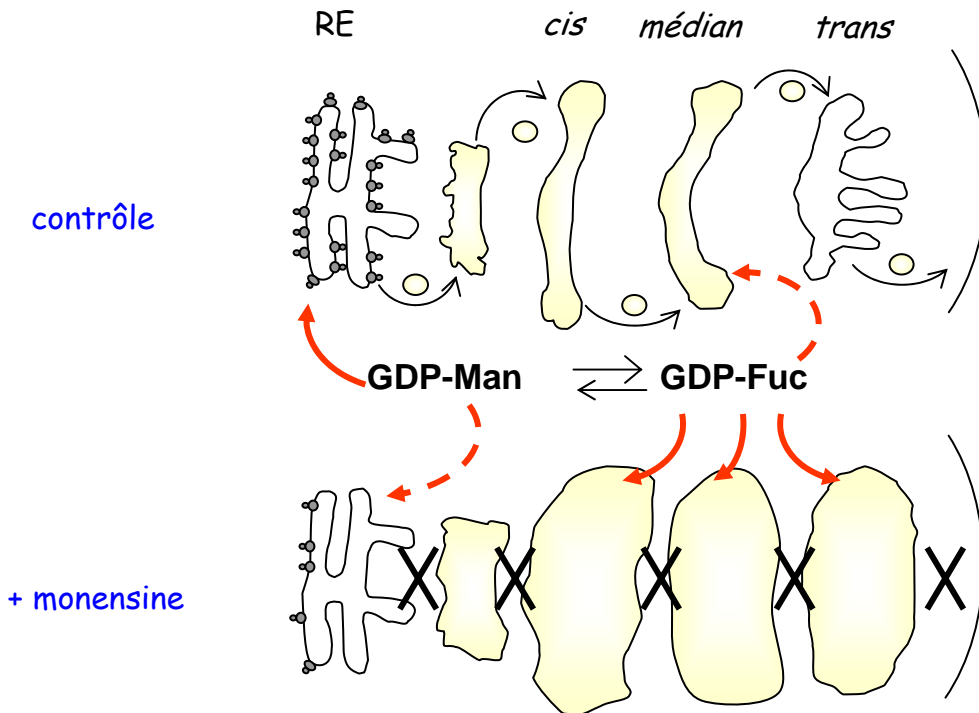


Figure 19 : Effets de la monensine

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.

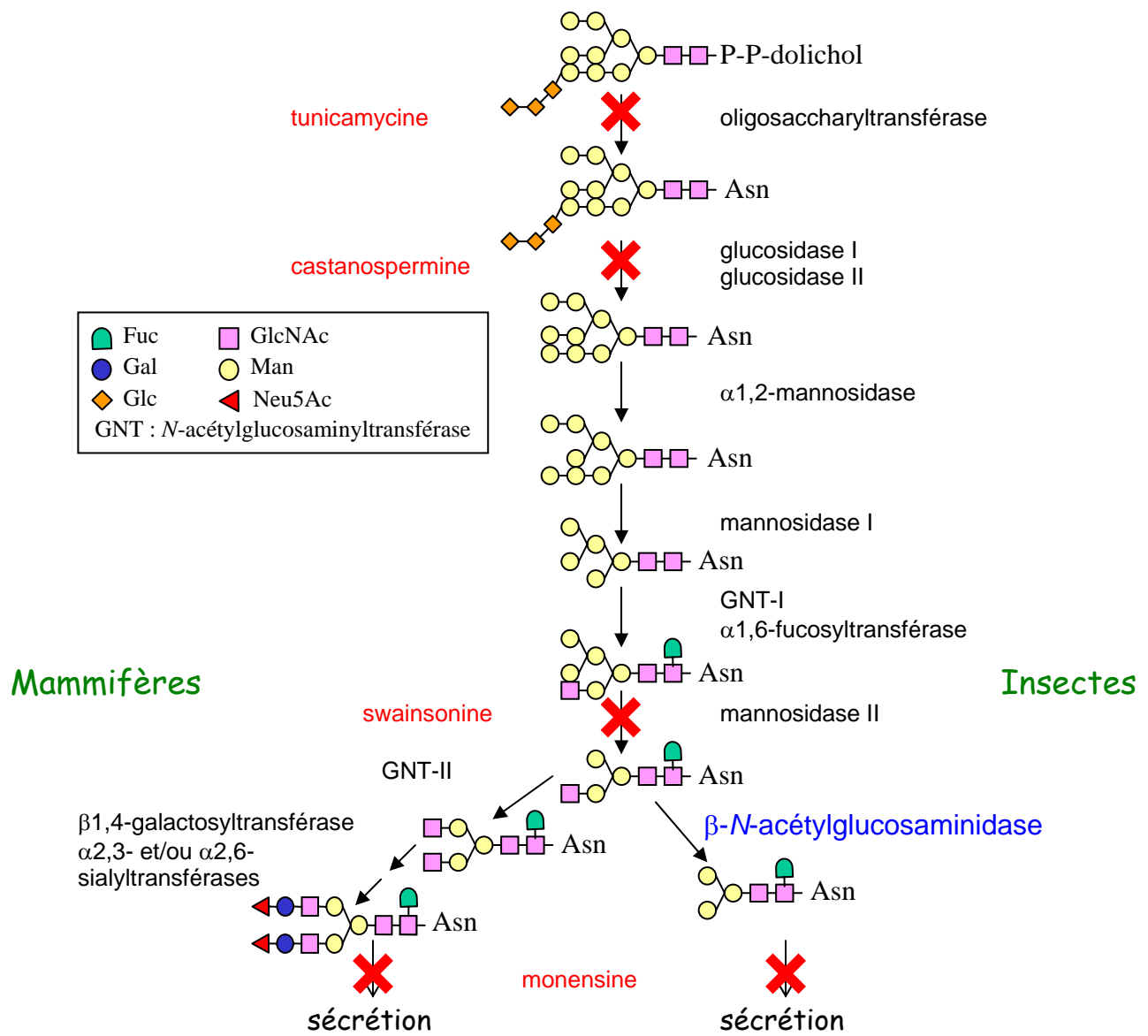


Figure 20 : Voies de maturation des N-glycannes dans les cellules de mammifères et d'insectes

D'après ces résultats, l'inactivation de la β -N-acétylglucosaminidase 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.

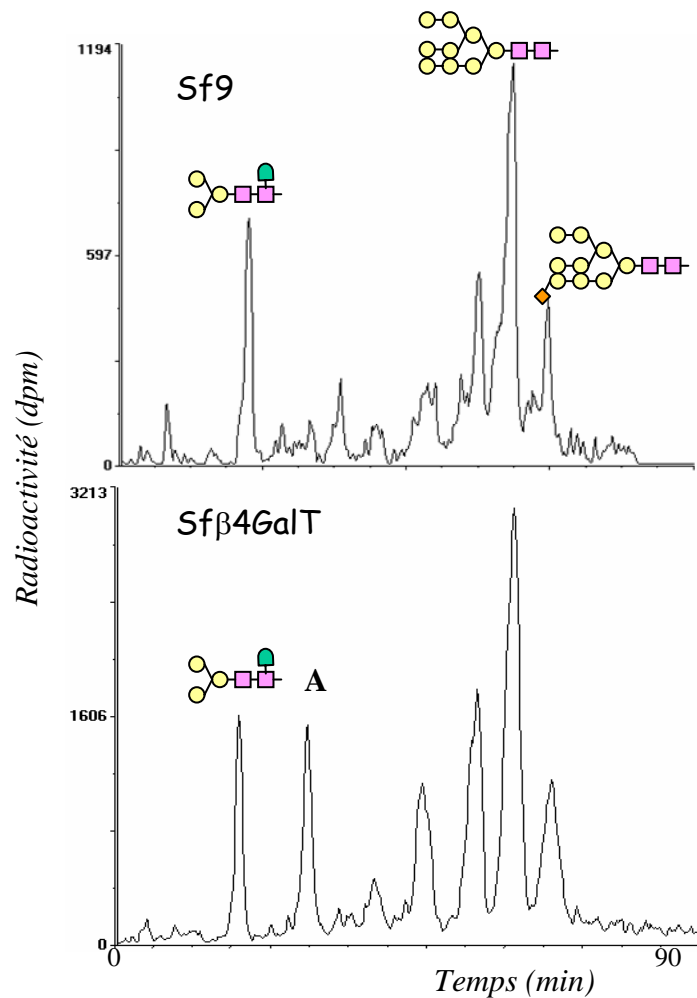


Figure 21 : Analyse par HPLC des *N*-glycannes marqués dans les cellules *Sf9* ou *Sfβ4GalT*

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.

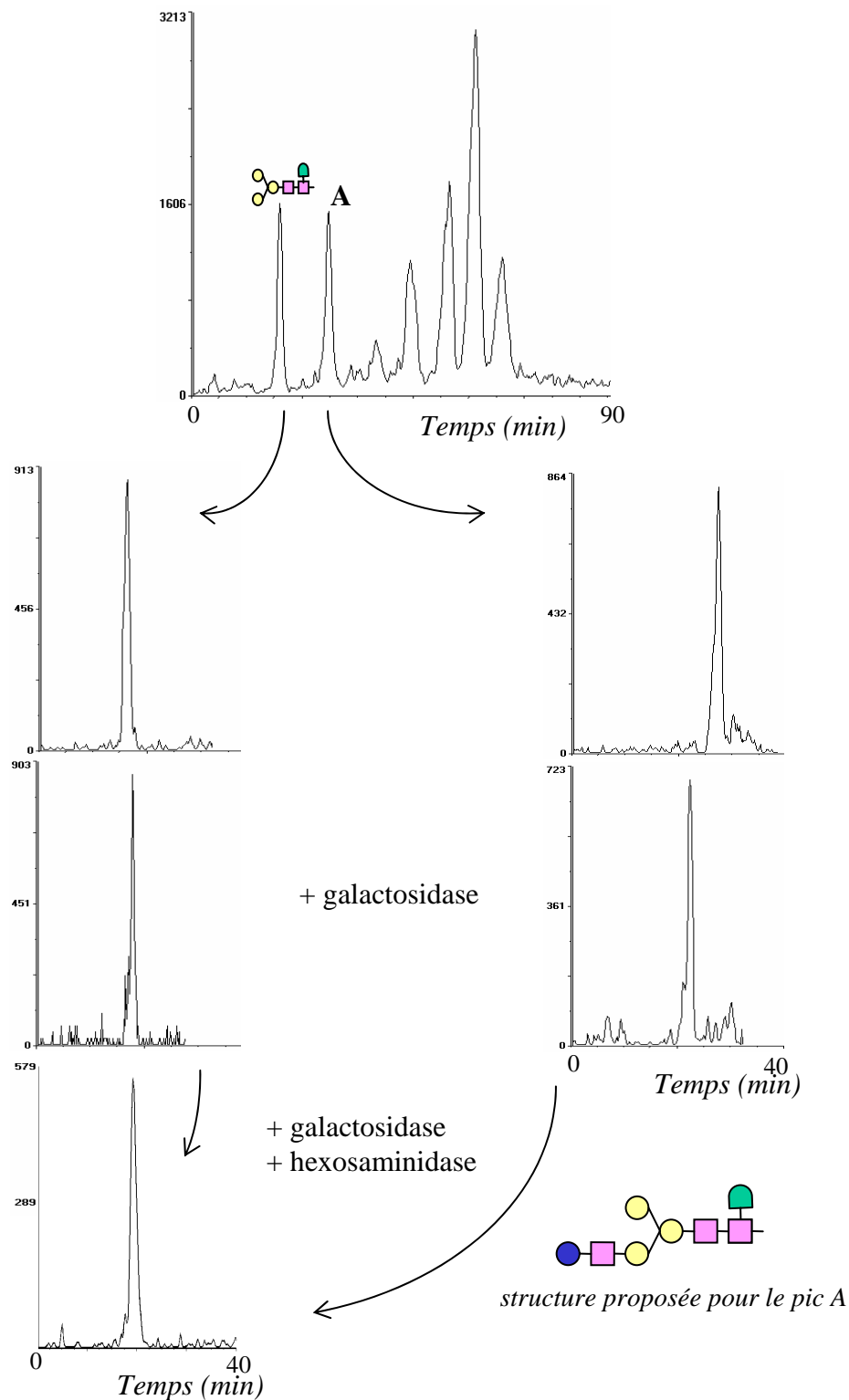


Figure 22 : Détermination de la structure représentée par le pic A

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.

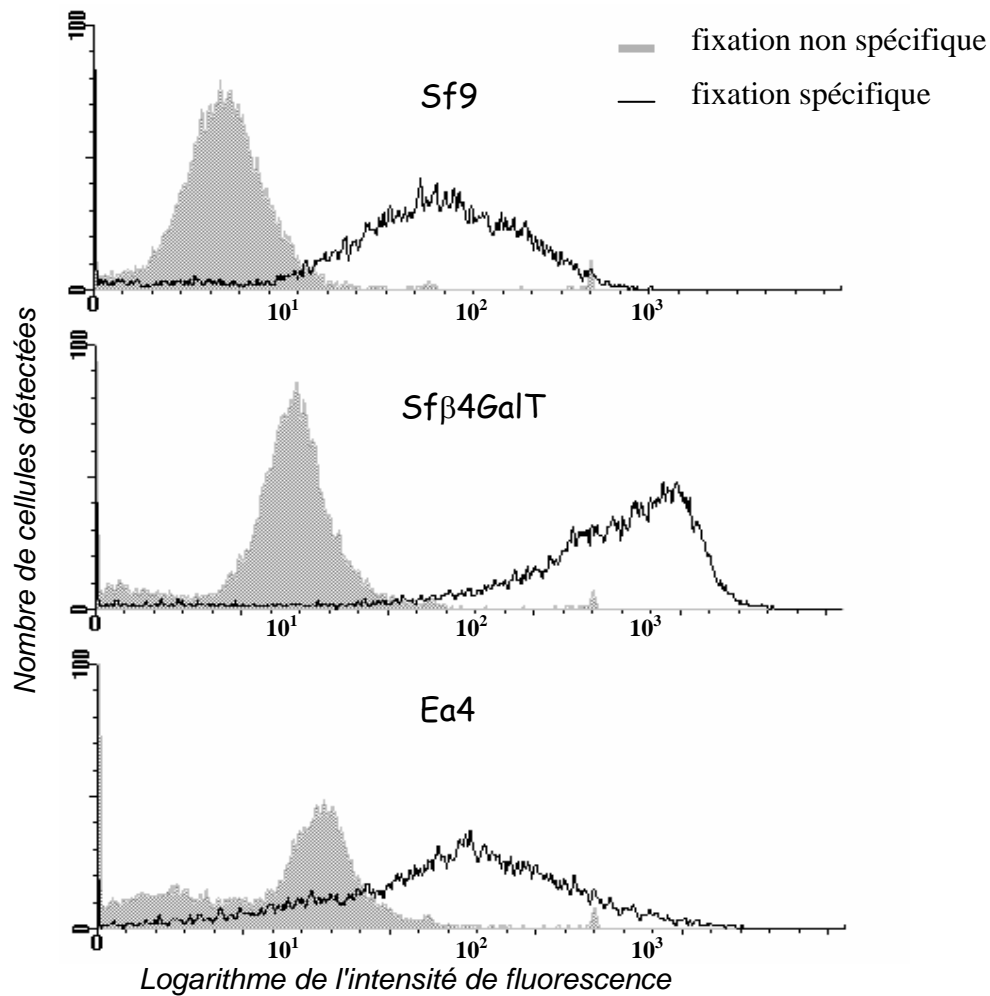


Figure 23 : Analyse de la galactosylation de surface par cytofluorimétrie de flux

Les cellules ($0,5$ à 1×10^6 cellules par expérience) ont été incubées en présence de RCA₁₂₀ à $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ et de $5 \text{mg}/\text{mL}$ 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.

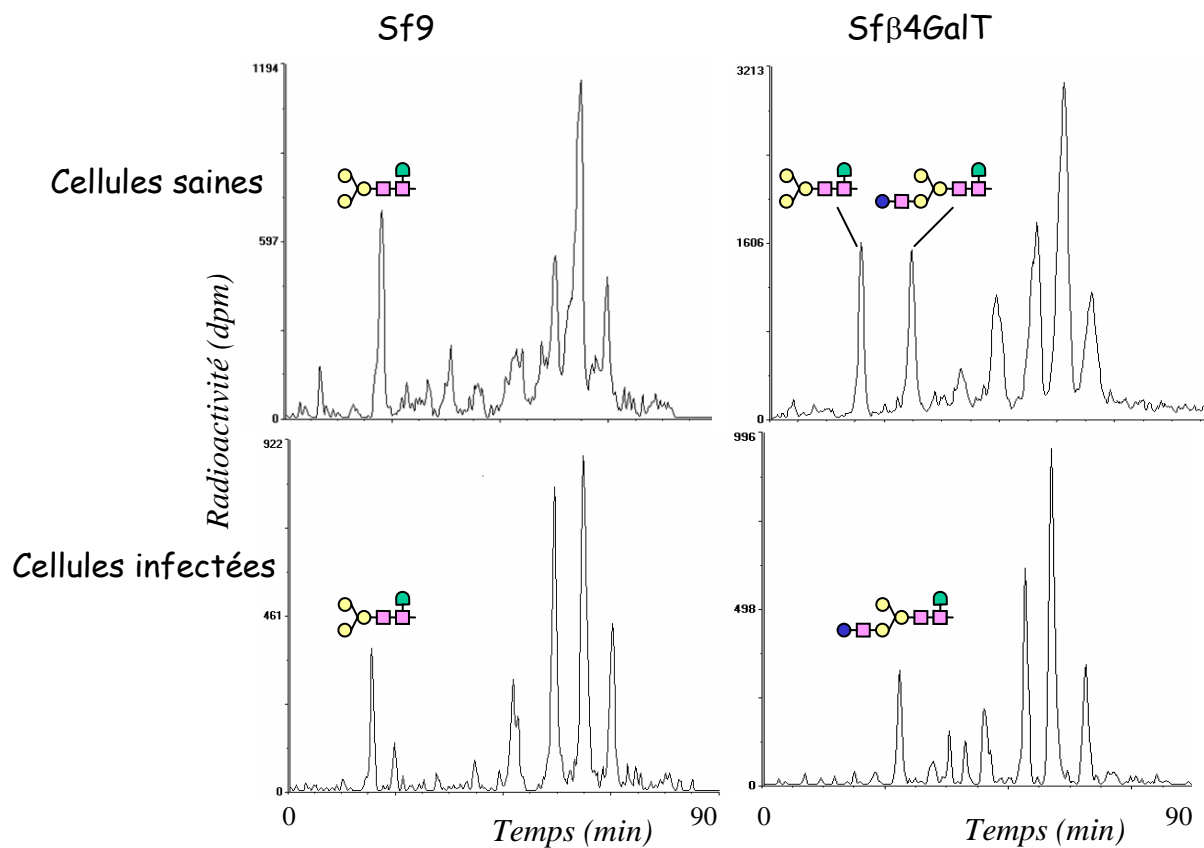


Figure 24 : Profils HPLC des N-glycannes synthétisés par les cellules Sf9 ou Sfβ4GalT saines ou infectées par un baculovirus

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- ^3H 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 Sfβ4GalT, 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.

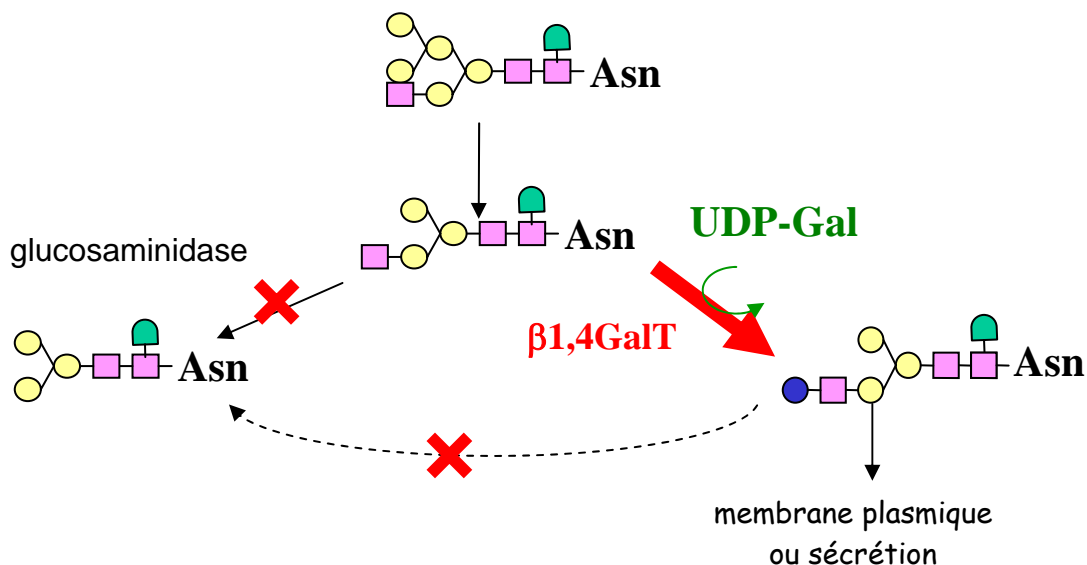


Figure 25 : Schéma de la voie de maturation des *N*-glycannes dans les cellules d'insectes exprimant la β 1,4-galactosyltransférase

La galactosylation de l'intermédiaire GlcNAc[Fuc]Man₃GlcNAc₂ 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.

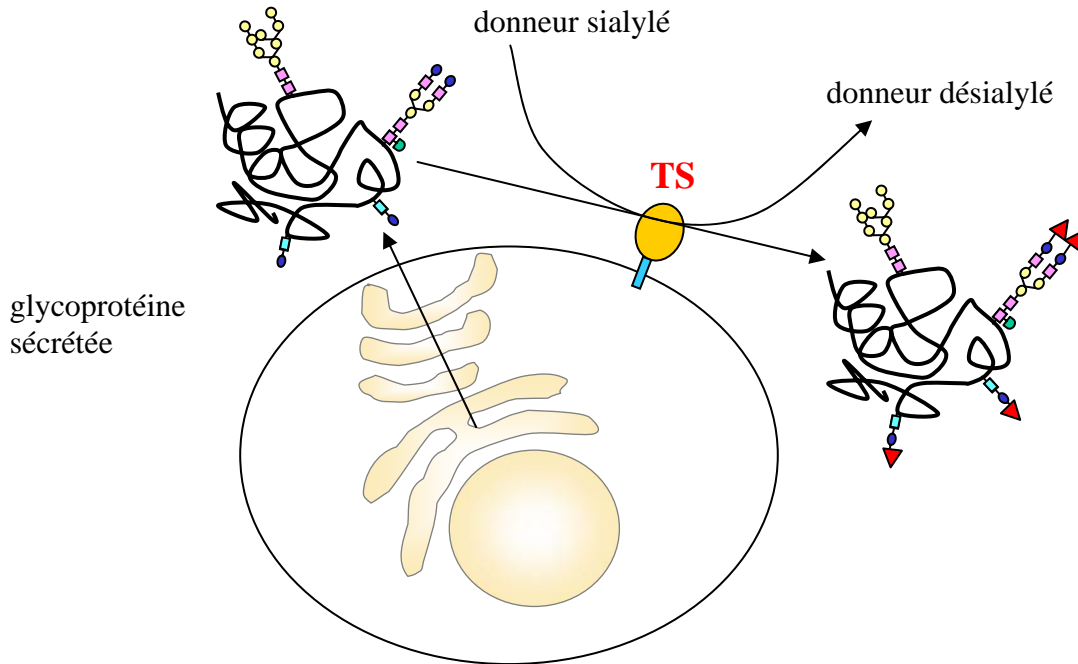


Figure 26 : Stratégie d'ingénierie de la sialylation dans le système baculovirus-cellules d'insectes utilisant une trans-sialidase

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.

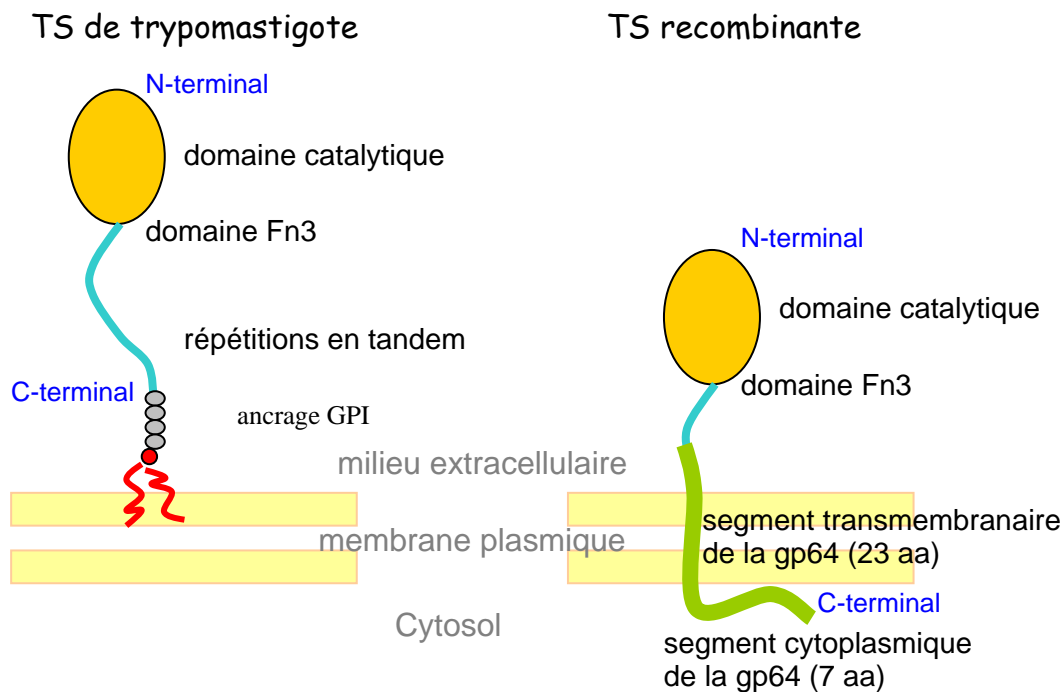


Figure 27 : Comparaison entre la structure de la trans-sialidase native et la structure attendue de la trans-sialidase chimérique

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-glucosyltransferase 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.

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.

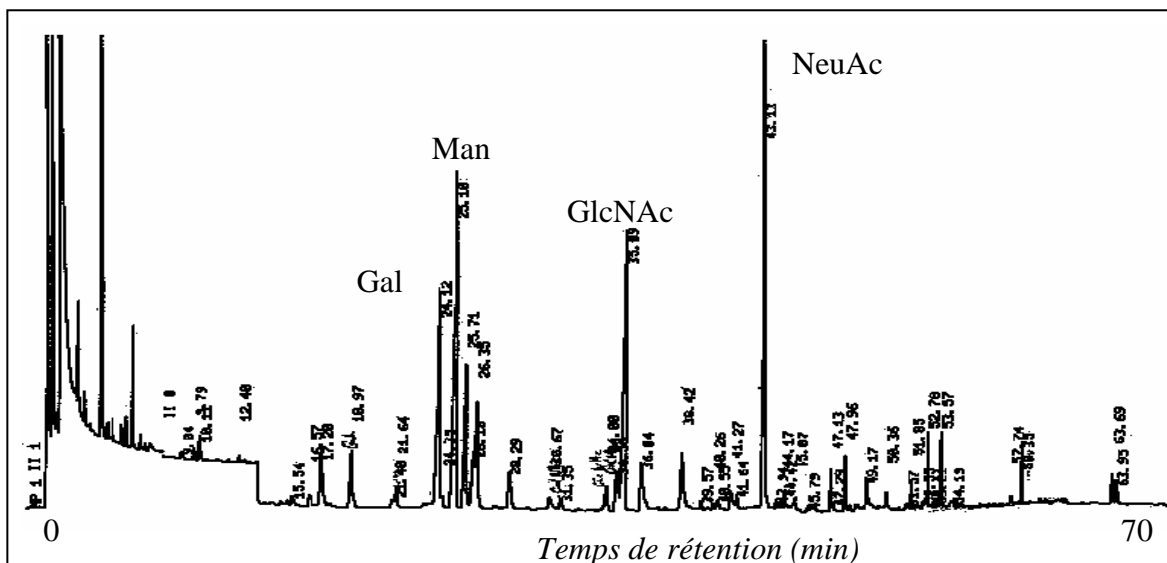


Figure 28 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides de l'orosomucoïde resialylé

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 fétuine 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 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.

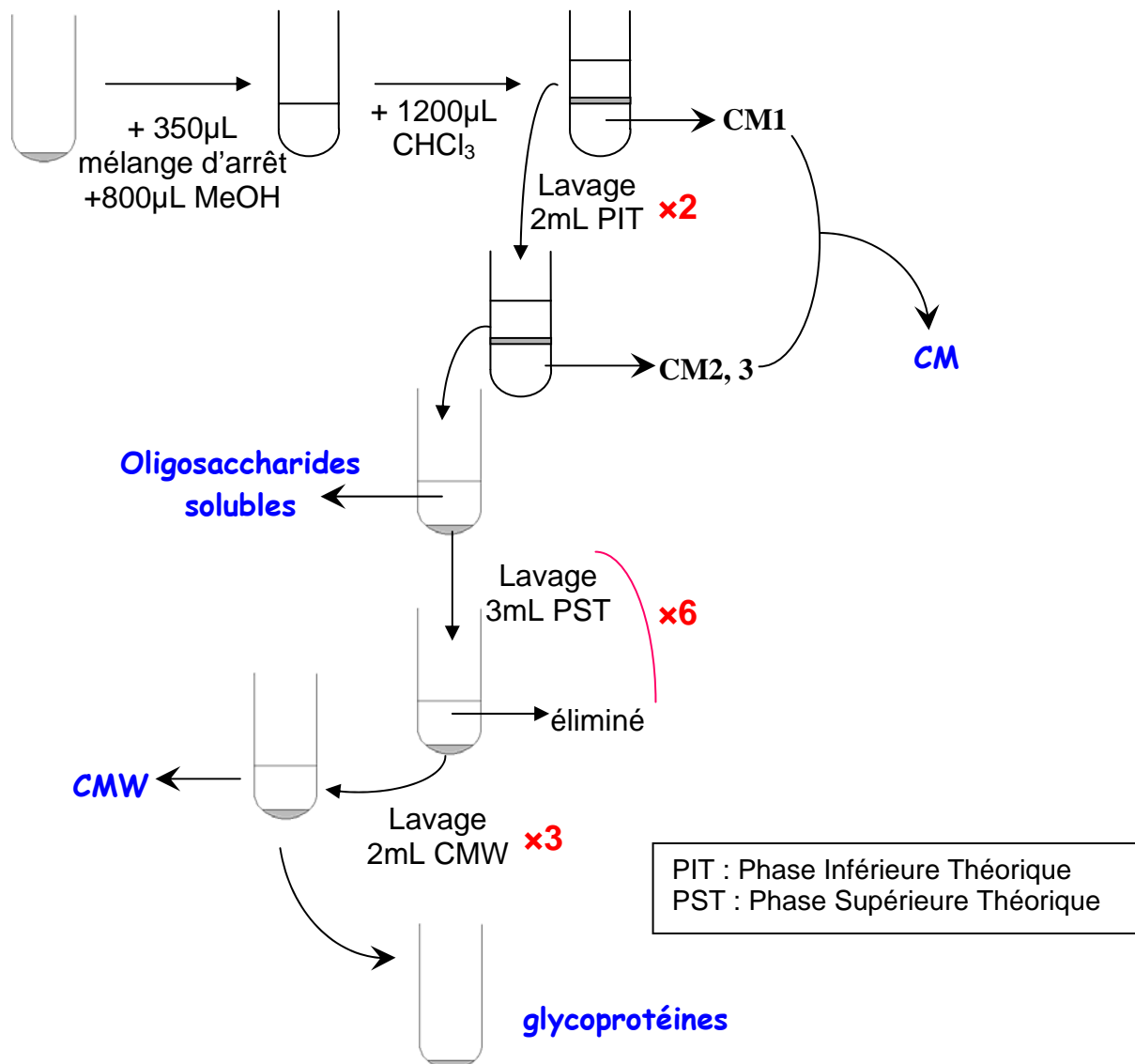


Figure 29 : Extractions séquentielles des intermédiaires du cycle des dolichols, d'après Cacan et Verbert, 1995.

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'hydrolysat 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 Sfβ4GalT, 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 séralbumine 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.

*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., Kedeas, 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., Vliegthart, 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-sialidases 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. & Sz kudlinski, 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., Kawar, 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 alpha1,2-mannosidase. *Glycobiology* **10**(4), 347-55.
- Kean, E. L. (1991). Sialic acid activation. *Glycobiology* **1**(5), 441-7.
- Kedeas, 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., Muhlfordt, 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. & Joziase, 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., Opdenakker, 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.