AYA BOUAZZA

PURIFICATION, CARACTÉRISATION ET ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS IMMUNOSTIMULANTES DE L'HÉMOCYANINE DE CRABE DES NEIGES, *CHINOECETES OPILIO*

Mémoire présenté

à la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en sciences et technologie des aliments pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION UNIVERSITÉ LAVAL QUÉBEC

2009

© Aya Bouazza, 2009

RÉSUMÉ COURT

L'hémocyanine est la protéine responsable du transport de l'oxygène dans le liquide physiologique (hémolymphe) d'un grand nombre d'invertébrés marins. Chez certaines espèces de mollusques (*Megathura crenulata* et *Concholepas concholepas*), l'hémocyanine a démontré d'intéressantes propriétés immunostimulantes. Le projet visait la purification de l'hémocyanine du crabe des neiges (*Chionoecetes opilio*) par chromatographie d'exclusion moléculaire, sa caractérisation (détermination de la taille moléculaire, du point isoélectrique, la présence ou non d'unités glucosidiques et d'activité phénoloxydase), et l'évaluation de son activité immunostimulante sur des macrophages de souris. Les caractéristiques de l'hémocyanine du crabe des neiges étaient généralement comparables à celles rapportées chez d'autres crustacés. Sur des macrophages de souris, elle a démontré une stimulation de la prolifération et du métabolisme cellulaire, de la production d'oxyde nitrique et de cytokines. Ces effets étaient comparables ou même supérieurs à ceux observés chez les préparations commerciales. Ces travaux permettront de générer des données précises sur l'hémocyanine en vue d'applications biomédicales.

AVANT-PROPOS

Le présent mémoire se veut un témoignage de la démarche scientifique résultant de la prise en charge et la conduite à terme d'un projet visant l'évaluation du potentiel immunostimulant d'une biomolécule de nature protéique, l'hémocyanine, présente dans l'hémolymphe du crabe des neiges, et d'un grand intérêt pour son potentiel thérapeutique. Ce sujet relève de l'interface entre la biochimie et l'immunologie. Ce mémoire comporte une revue de littérature écrite en français et deux articles scientifiques, dont je suis l'auteure principale, rédigés en anglais et précédés chacun par un résumé en français.

L'introduction générale présente la problématique de recherche et les principaux objectifs réalisés au cours de ce projet. Le premier chapitre présente une revue de littérature sur le sujet où les concepts et les connaissances pertinents sur l'hémocyanine sont traités, tout en abordant les propriétés et les applications potentielles. Le deuxième et le troisième chapitre présentent les résultats de ce projet, rédigés sous forme d'articles scientifiques qui seront soumis prochainement dans des journaux scientifiques.

Le Chapitre II, intitulé « Purification et caractérisation de l'hémocyanine du crabe des neiges, *Chionoecetes opilio*», constitue la première étape de mes travaux. Ceux-ci ont été effectués au Centre Technologique des Produits Aquatiques (CTPA), à Gaspé, sous la direction du Dr Serge Laplante. Ce chapitre est présenté sous forme d'un article scientifique rédigé en anglais et fera l'objet d'une soumission au journal Comparative Biochemistry and Physiology.

Le Chapitre III, portant le titre «Comparaison des propriétés immunostimulantes de l'hémocyanine de crabe des neiges, *Chionoecetes opilio*, par rapport à d'autres sources disponibles», est consacré à l'étude comparative des réponses immuno-modulatrices des différentes fractions purifiées d'hémocyanine de crabe des neiges et des préparations commerciales d'hémocyanine, sur la lignée de macrophages de souris RAW 264.7.

Les tests d'activités immunostimulantes ont été réalisés chez Transbiotech, à Lévis, sous la supervision du Dr Yvan Boutin. Ce chapitre est présenté sous forme d'un article scientifique rédigé en anglais qui sera publié prochainement.

Enfin, une conclusion générale est présentée pour donner une vision globale de mes travaux de maîtrise, tout en mentionnant les résultats et les conclusions les plus importants qui en ressortent, ainsi qu'en soulignant leurs impacts et les perspectives d'avenir.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon-codirecteur de recherche Dr Serge Laplante. Je le suis vivement reconnaissante pour sa disponibilité sans limite qu'il m'a généreusement offerte, ainsi que son précieux soutien et ses encouragements.

Je souhaite également remercier mon directeur de recherche Dr Ismail Fliss qui a assuré la direction de mon projet.

Je remercie Dr Yvan Boutin pour sa collaboration dans ce projet et ses suggestions pertinentes.

De plus, mes remerciements s'adressent à toutes et tous mes collègues du Centre Technologique des Produits Aquatiques (CTPA) à Gaspé, dont Diane Ouellet, Jacinthe Thibodeau, Nathalie Souchet, Lucie Beaulieu, Marie-Élise Carbonneau, Micheline Fournier, et Gaétan Côté, pour le temps et l'effort qu'ils ont investi tout au long de mon séjour au laboratoire.

Mes remerciements vont aussi à la Direction de l'Innovation et des Technologies (DIT-MAPAQ) et la Fondation Gaspésie- Les Iles (FCGI) pour leur support financier.

Je dédie ce travail à ma mère Saloua, mon père Ali, mes deux chères sœurs Imen et Yasmine, ainsi qu'à tous mes amis, qu'ils soient en Tunisie ou au Québec. Ils ont toujours cru en moi et m'ont donné le courage et la volonté d'aller au bout de moi-même.

Enfin, je remercie Dieu qui me guide tout au long de mon chemin et qui me permet de vivre en bonne santé.

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau 1.1 Composition chimique de l'hémolymphe de Cyanagrea praedator

Tableau 1.2 Les principales caractéristiques des trois protéines transporteurs d'oxygène..6

Chapitre II

Tableau 2.1 The biochemical composition of hemolymph from Chionoecetes opilio......49

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure 1.2 (A) Structure du site de liaison à l'oxygène de l'Hc du *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre sont représentés en bleu, l'oxygène en rouge (B) Structure secondaire de la sous-unité de l'Hc du mollusque *Octopus dofleini*, où deux domaines sont représentés : hélice α (rouge), feuillet β et les deux atomes de cuivre (bleu)......7

Figure 1.3 Reconstitution 3D à 15 Å de la forme native de l'Hc de Megathura crenulata..8

Figure 1.7 Peptides antimicrobiens de l'extrémité C-terminale de l'Hc de crustacés.....16

Chapitre II

Chapitre III

Figure 3.1	Effect of different types of Hc on RAW 264.7 cell viability following exposu	ire
to different	concentrations of Hc	66

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Å : Angström aa : Acides aminés ApoHc : Apohémocyanine BCA : Acide Bicinchoninique BSA: Bovine serum albumin Ca: Calcium CaCl₂: Chlorure de calcium CCH: Concholepas concholepas Hemocyanin COH : Chionoecetes opilio Hemocyanin CQVB : Centre Québécois de Valorisation des Biotechnologies Cu: Cuivre Da: Dalton D-GlcNAc: N-acétyl-D-galactosamine D-Man: D-Mannose DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay FAAS : Spectroscopie d'absorption atomique de flamme Fe : Fer Hc : Hémocyanine Hcs: Hémocyanines HTH: Haliotis teberculata Hemocyanin IEF : Focalisation isoélectrique IFN- γ : interferon- γ IL : Interleukine iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible kDa: Kilodalton Kg: Kilogramme KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin Lbs : Livres L-DOPA : 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine LPH: Limulus polyphemus Hemocyanin LPS: lipopolysaccharide MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec MBT-2: Murine bladder tumor model Mw: Masse Moléculaire N2O3: Trioxyde de diazote NO : Oxyde nitrique NO₂⁻: nitrites NO3⁻: nitrates NOS : Oxyde nitrique synthase PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

ix

PBS : Phosphate buffered saline

PGs : les prostaglandines

PME : Petites et moyennes entreprises

PO: Phénoloxydase

PPO: Prophénoloxydase

PsHct : Peptide antimicrobien purified from Penaeus stylirostris

PvHct : Peptide antimicrobien purifié de l'hémocyanine de Penaeus vannamei

SDS : Dodécylsulfate de sodium

TNF-α : Facteur nécrosant tumoral alpha

Tris: Trishydroxyméthylaminométhane

Tris-HCl : Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ COURTii			
AVANT-PROPOSiii			
REMERCIEMENTS v			
LISTE DES TABLEAUX vi			
LISTE DES FIGURES vii			
LISTE DES ABBRÉVIATIONS ix			
TABLE DES MATIÈRES xi			
INTRODUCTION GÉNÉRALE 1			
CHAPITRE I			
Revue de littérature			
1.1 Hémocyanine			
1.1.1 Historique			
1.1.2 Définition			
1.1.3 Structure et biodiversité de l'hémocyanine			
1.1.3.1 Chez les mollusques			
1.1.3.2 Chez les arthropodes			
1.1.3.3 Chez les crustacés			
1.1.4 Glycosylation des hémocyanines			
1.1.5 Propriétés biologiques de l'hémocyanine			
1.1.5.1 Activité phénoloxydase et mélanisation			
1.1.5.2 Activité antimicrobienne			
1.1.5.2.1Peptides antimicrobiens activateurs de l'hémocyanine			
1.1.5.2.2Hémocyanine : source de peptides antimicrobiens 15			
1.1.6 Propriétés immunostimulantes			

1.1.7	Propriétés immunogènes
1.1.8	Sources disponibles d'hémocyanine
1.1.8.	Préparations d'hémocyanines commerciales disponibles 19
1.2	Crabe des neiges (Chionoecetes opilio)
1.2.1	Classification (Système Intégré d'Information Taxonomique) 20
1.2.2	Provenance
1.2.3	Morphologie et développement
1.2.4	Industrie de la transformation du crabe des neiges au Canada22
1.2.5	Coproduits de la transformation du crabe des neiges au Québec 23
1.2.5.	1 Biomolécules présentes dans les co-produits du crabe des neiges 23
1.2.5.	2 Biomolécules actives présentes dans d'autres biomasses marines 24
1.3	Réponse immunitaire
1.3.1	Immunité innée
1.3.2	Immunité adaptive
1.3.3	Médiateurs de l'inflammation
1.3.3.	1 Cytokines
1.3.3.	2 Oxyde nitrique
1.4 d'arth	Méthodes d'extraction, purification et caractérisation des hémocyanines propodes
1.4.1	Prélèvement et conservation de l'hémolymphe 29
1.4.2	Extraction et fractionnement de l'hémocyanine à partir de l'hémolymphe
1.4.3	Purification de l'hémocyanine
1.4.4	Détermination de la taille moléculaire de l'hémocyanine et de ses sous-unités 30
1.5	Problématique et contexte du projet de recherche
1.6	Hypothèse et objectifs
1.6.1	Hypothèses
1.6.2	Objectifs spécifiques

xii

CHAPITRE II: Purification et caractérisation de l'hémocyanine du crabe des neiges, Chionoecetes opilio		
Résumé		
2.1	Introduction	
2.2	Materials and methods	
2.2.1	Animal collection and hemolymph sampling	
2.2.2	Hemolymph global composition analysis	
2.2.3	Protein purification	
2.2.4	Subunit dissociation and reassembly experiments	
2.2.5	Electrophoresis	
2.2.6	Glycoprotein detection	
2.2.7	Assay for the determination of phenoloxydase activity	
2.3	Results	
2.3.1	Hemolyphm composition	
2.3.2	Hc purification	
2.3.3	Dissociation-reassociation experiments	
2.3.4	Electrophoresis analysis	
2.3.5	Glycoprotein content	
2.3.6	Phenoloxidase activity	
2.4	Discussion	
2.4.1	Hemolymph composition	
2.4.2	Purification of Hc	
2.4.3	Dissociation and reassembly of Hc	
2.4.4	Subunit hetorogeneity	
2.4.5	Detection of glycosidic units	
2.4.6	Phenoloxidase activity	
2.5	Conclusions	

crabe des neiges, Chionoecetes opilio, par rapport a d'autres sources disponibles			
Résumé			
3.1	Introduction		
3.2	Materials and Methods		
3.2.1	Hemocyanin preparations		
3.2.2	Protein determinations		
3.2.3	Cell culture		
3.2.4	Effect of Hc preparations on cell growth and metabolism stimulation 59		
3.2.5	Effect of Hc preparations on nitrous oxide (NO) production 59		
3.2.6	Effect of Hc preparations on cytokine production		
3.2.7	Statistical analysis		
3.3	Results		
3.3.1	Effect of Hc preparations on the stimulation of cell growth and metabolism 60		
3.3.2	Effect of Hc preparations on nitrous oxide (NO) production		
3.3.3	Effect of Hc preparations on cytokine production		
3.4	Discussion		
3.5	Conclusions		
CONCLUSION GÉNÉRALE			
BIBLIOGRAPHIE			

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans l'industrie de la pêche au Québec, les co-produits du crabe des neiges représentent une source importante de biomolécules marines à haute valeur actuellement inexploitées. En effet, des estimations récentes sur la pêche du crabe des neiges au Québec indiquent des volumes globaux de transformation d'environ 13 mille tonnes, pouvant générer près de 4 mille tonnes de co-produits disponibles annuellement. Or, le développement de procédés d'extraction et de fractionnement de biomolécules à haute valeur à l'échelle pilote est actuellement en cours au CTPA (Centre Technologique des Produits Aquatiques, Gaspé). Ces procédés visent la récupération intégrée de diverses biomolécules d'intérêt commercial. À partir des co-produits du crabe des neiges, le liquide physiologique (hémolymphe) contient une nouvelle biomolécule ciblée d'un grand intérêt pour ses propriétés thérapeutiques : l'hémocyanine.

L'hémocyanine est la protéine responsable du transport de l'oxygène dans l'hémolymphe de plusieurs espèces de crabes, mollusques, crustacés, et autres invertébrés marins. Chez certaines espèces de mollusques, l'hémocyanine a démontré d'intéressantes propriétés immunostimulantes. Lorsqu'elle est injectée à l'homme, le système immunitaire répond non seulement en attaquant la protéine, mais aussi en détruisant la tumeur. Plusieurs études ont démontré des propriétés thérapeutiques de l'hémocyanine contre divers types de cancers, dont le cancer du sein, de la prostate, du pancréas, de la vessie, et de l'adénocarcinome œsophagien de Barrett. Le mécanisme d'action de l'hémocyanine implique un effet immuno-modulateur sur plusieurs types de cellules du système immunitaire, résultant en une mort des cellules tumorales.

L'efficacité élevée et la toxicité minimale de l'hémocyanine à des fins thérapeutiques représentent actuellement un très grand engouement pour des applications biomédicales comme les traitements anticancéreux. Cependant, il y a actuellement très peu d'entreprises qui commercialisent l'hémocyanine, d'où d'importantes opportunités commerciales pour de nouvelles PME. De plus, certaines espèces de mollusques sont actuellement surexploitées aux États-Unis pour en extraire l'hémocyanine, qui est hors de prix.

Cela justifie l'intérêt d'explorer de nouvelles sources d'hémocyanine dont les co-produits du crabe des neiges (*Chionoecetes opilio*). Aucune étude n'a encore été rapportée sur cette source d'hémocyanine. Ainsi, la présente étude vise la purification, la caractérisation et l'étude du potentiel immunostimulant de cette biomolécule d'intérêt thérapeutique en la comparant à d'autres préparations commerciales qui sont actuellement disponibles.

CHAPITRE I

Revue de littérature

1.1 Hémocyanine

1.1.1 Historique

Paul Bert a observé pour la première fois en 1867 un pigment incolore bleuissant au contact de l'air dans l'hémolymphe d'un mollusque céphalopode, la seiche *Octopus vulgaris* (Ghiretti-Magaldi et Ghiretti, 1992). Quelques années plus tard, Léon Fredericq lui a donné le nom d'hémocyanine, correspondant à l'association des racines grecques *haima* (sang), et *cyanos* (bleu) (Fredericq, 1878).

1.1.2 Définition

L'hémocyanine (Hc) est une protéine de la famille des métalloprotéines (Makino, 1985), responsable du transport de l'oxygène dans les tissus de certains invertébrés, dont les arthropodes et les mollusques (van Holde et Miller, 1995). Il s'agit de la principale protéine retrouvée dans le liquide physiologique (hémolymphe) ayant un rôle similaire au sang chez les vertébrés (Markl, 1986; Sanchez et al., 1998). Elle peut atteindre jusqu'à 90% de la teneur en protéines totales (Salvato et Beltramini, 1990).

Des analyses de l'hémolymphe du crabe *Cyanagrea praedator* (Chausson et al., 2001) ont révélé une composition ionique comparable à celle d'autres crustacés, où le cuivre est la composante prédominante. Environ la moitié du cuivre est liée à l'Hc, qui représente seulement 48.3% des protéines totales, sans tenir compte de la présence d'apohémocyanine (apoHc), ne contenant pas de cuivre (Tableau 1.1).

³	Moyenne	±s	n
Sodium (mM)	479.64	43.68	19
Chlorure (mM)	421.67	46.12	21
Potassium (mM)	8.65	2.23	19
Calcium (mM)	14.92	6.17	19
Magnésium (mM)	21.60	9.29	19
Cuivre total (µM)	2015.20	996.21	. 18
Cuivre lié à l'Hc (µM)	1079.39	482.42	12
Protéines (g/l)	82.55	49.32	13
Hémocyanine (g/l)	39.89	17.49	13

Tableau 1.1 Composition chimique de l'hémolymphe de Cyanagrea praedator

 (Chausson et al., 2001).

n= nombre d'individus

1.1.3 Structure et biodiversité de l'hémocyanine

Parmi les diverses métalloprotéines connues (Tableau 1.2), l'Hc se distingue par la présence de 2 atomes de cuivre liés par coordination à une chaîne polypeptidique (Beltramini et al., 2005). Ces atomes sont responsables de la liaison réversible de l'oxygène moléculaire (O₂), où la forme oxygénée du site de liaison est responsable de la couleur bleue de l'Hc (Figures 1.1 et 1.2). Chaque chaîne polypeptidique comportant un site de liaison à l'oxygène constitue la sous-unité de base de toutes les sources d'hémocyanines (Hcs) connues à ce jour. Bien qu'elle soit présente chez les mollusques et les arthropodes, la structure de l'Hc est totalement différente entre ces 2 embranchements (Salvato et Beltramini, 1990).

Pigment	Hémoglobine	Hémocyanine	Hémérythrine
Taille moléculaire (Da)	65,000 - 2,000,000	350,000 - 10,000,000	108,000
Ion métallique (site de fixation de l'O ₂)	Fe ²⁺ / Fe ³⁺ 1 atome/sous-unité	Cu ⁺ /Cu ²⁺ 2 atomes/sous-unité	Fe ²⁺ / Fe ³⁺ 2 atomes/sous-unité
Présence de pigment associé	Porphyrine (hème)	Chaines protéiques	Chaines protéiques
Couleur (forme oxygénée)	Rouge vif	Bleu	Violet-rose
Couleur (forme désoxygénée)	Rouge sombre	Incolore	Incolore
Localisation	Extracellulaire/ Intracellulaire	Extracellulaire	Intracellulaire

Tableau 1.2Les principales caractéristiques des trois protéines transporteurs d'oxygène(Makino et al., 1985; Holmes et al., 1991; Shen et al., 1993).



Figure 1.1 Forme désoxygénée (Cu(I) - Cu(I)) et forme oxygénée (Cu(II)- $O_2^{2^2}$ -Cu(II)) du site actif de transport de l'oxygène de l'Hc. Chaque atome de cuivre est lié à 3 résidus histidine. (Karlin et al., 1987; Hazes et al., 1993; Fariselli et al., 1999)



Figure 1.2 (A) Structure du site de liaison à l'oxygène de l'Hc du *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre sont représentés en bleu, l'oxygène en rouge (Magnus et al., 1994). **(B)** Structure secondaire de la sous-unité de l'Hc du mollusque *Octopus dofleini*, où deux domaines sont représentés : hélice α (rouge), feuillet β et les deux atomes de cuivre (bleu) (Cuff et al., 1998).

1.1.3.1 Chez les mollusques

Au sein de l'embranchement des mollusques, seules 4 classes ont révélé la présence d'Hc : les chitons, les gastéropodes, les bivalves et les céphalopodes (van Holde et Miller, 1995). Les Hcs de mollusques sont constituées de larges structures cylindriques (décamères) formées de l'association de 10 sous-unités polypeptidiques de masses moléculaires comprises entre 350 et 450 kDa. Chaque sous-unité est constituée de 7 ou 8 domaines (unités fonctionnelles) de masses moléculaires de 45-55 kDa, renfermant chacuns une paire d'atomes de cuivre liés permettant la liaison réversible d'une molécule d'oxygène (van Holde et Miller, 1982; Herskovits, 1998; De Ioannes et al., 2004). Chez les bivalves et les gastéropodes, les sous-unités s'associent en didécamères de masses moléculaires de 3,500 à 4,500 kDa, pouvant s'associer à leur tour en énormes structures multidécamériques de tailles allant au-delà de 8,000 kDa (De Ioannes et al., 2004). Parmi les Hcs les plus étudiées à ce jour, mentionnons celle du mollusque marin *Megathura crenulata*, aussi connu sous le nom de « Keyhole Limpet Hemocyanin» (ou KLH), où la forme native est un didécamère d'environ 8,000 kDa formé de l'assemblage de 10 sousunités d'environ 350 kDa et 400 kDa (Figure 1.3). L'architecture de ce complexe didécamérique ressemble à un cylindre creux avec des unités murales formant une hélice droite. Les parois du cylindre semblent composées de couches annulaires superposées (Terwilliger et al., 1982). Mentionnons qu'il existe une grande similarité structurale entre la KLH et l'Hc du mollusque marin *Concholepas concholepas* (CCH), qui a été très étudié à ce jour (van Holde et Miller, 1995; De Ioannes et al., 2004).



Figure 1.3 Reconstitution 3D à 15 Å de la forme native de l'Hc de *Megathura crenulata* (Keyhole Limpet). Vues passant de polaire (A) à latérale (D). La molécule native est formée de l'assemblage de deux décamères par leur partie basale, tel qu'indiqué sur l'image D (formant un didécamère) (Orlova et al., 1997).

1.1.3.2 Chez les arthropodes

L'Hc des arthropodes est généralement un hexamère d'environ 450 kDa constitué de l'association de six sous-unités (monomères) d'environ 75 kDa, où chaque sous-unité porte 2 atomes de cuivre pouvant lier une molécule d'oxygène (Figure 1.4). Les hexamères peuvent s'associer en multi-hexamères de très grandes tailles (2x6-mer, 4x6-mer, 8x6-mer, 16x6-mer, etc.) dont le degré d'assemblage varie selon l'espèce et les conditions physiologiques (Markl and Decker, 1992; van Holde et Miller, 1995).

Des Hcs ont été détectées chez tous les sous-embranchements des arthropodes puisqu'elles sont présentes chez les ancêtres communs des chélicérés, crustacés, myriapodes, et les insectes (Markl and Decker, 1992; van Holde and Miller, 1995; Burmester, 2001).

Cependant, il est à noter qu'au cours de leur évolution récente, beaucoup d'arthropodes, comme les moustiques chironomidés ou les branchiopodes (petits crustacés aquatiques) (Weber et Vinogradov, 2001), ont perdu leur Hc qui est devenue un pigment intracellulaire.

La famille des Hcs d'arthropodes inclut d'autres types de protéines qui partagent des similarités structurales mais des fonctions distinctes (van Holde et Miller, 1982; Ellerton et al., 1983; Linzen et al., 1985; Salvato et Beltramini, 1990; Markl et Decker, 1992; Beintema et al., 1994; Burmester et Scheller, 1996).



Figure 1.4 Structure de l'Hc des arthropodes. (a) Site de fixation de l'oxygène; (b) sousunité contenant 650 aa; (c) structure simplifiée d'hexamère; (d) structure multi-hexamère simplifiée (4x6 hémocyanine) (Markl et Decker, 1992).

Des études de cristallographie par rayons X ont été réalisées afin d'élucider la structure secondaire des sous-unités des Hcs provenant de certains arthropodes, dont la langouste *Panulirus interruptus* (Volbeda et Hol, 1989; Gaykema et al., 1984) et de la limule *Limulus polyphemus* (Hazes et al., 1993). Ces études ont révélé que les sous-unités de ces Hcs sont généralement formées de trois principaux domaines structuraux (Figure 1.5). Le domaine 1, formé de 150-180 acides aminés (aa) présente une structure hélicoïdale (en hélice α) et qui est très variable dans sa séquence. Le domaine 2 (environ 220 aa) situé entre les domaines 1 et 3, présente une structure hélicoïdale, et contient les atomes de cuivre CuA et de CuB, chacun étant lié à 3 chaînes latérales d'histidine. Les six histidines liées aux ions de cuivre sont respectivement situées aux positions 193, 197, et 225 pour le CuA, et 344, 348, et 384

pour le CuB. Le domaine 3 (environ 360 aa) adopte une conformation en feuillet β qui forme la structure secondaire.





Figure 1.5 (A) Les différents domaines de la sous-unité de l'Hc des arthropodes. (B) La structure tertiaire de la sous-unité de l'Hc du *Limulus polyphemus* (Hazes et al., 1993). Les 3 domaines : 1 (vert), 2 (rouge) et 3 (bleu).

1.1.3.3 Chez les crustacés

Chez les crustacés, les Hcs possèdent une importante diversité structurale ainsi qu'une grande hétérogénéité des sous-unités présentes au sein de la même protéine. Cette diversité a permis de mieux retracer l'origine ancestrale entre ces espèces (Hughes, 1999; Decker et Terwilliger, 2000; van Holde et al., 2001; Burmester, 2004). Une telle diversité est expliquée par l'adaptation physiologique respiratoire à des environnements diversifiés, par le biais de mécanismes extrinsèques ou intrinsèques. Les mécanismes extrinsèques impliquent l'influence des ions, pH, température et neurohormones sur l'affinité à l'oxygène (Morris, 1990; Burnett, 1992; Bridges, 2001). Les mécanismes intrinsèques impliquent l'influence des changements structuraux de l'Hc (ratio de ses différents états d'agrégation, proportion des diverses sous-unités) sur l'affinité à l'oxygène (Giomi et Beltramini, 2007).

Divers états d'association sont retrouvés au niveau des Hcs de crustacés. Dans les conditions physiologiques, l'Hc du crabe royal (*Paralithodes camtschaticae*) est constituée à 80% de dodécamères (2x6-mère) et 20% d'hexamères (1x6-mère) (Molon et al., 2000). Chez les sous-espèces Palinura, dont *Panulirus interruptus* (Kuiper et al., 1975) et *Panulirus japonicum* (Makino, 1986) ainsi que chez les Isopodes, dont *Bathynomus giganteus* (van Holde et Brenowitz, 1981), on retrouve seulement la forme hexamère. Chez les Astacura, seule la forme dodécamère est retrouvée, tel que l'Hc de *Homarus americanus* et *Astacus* (Markl, 1986; Herskovits, 1988). De plus, parmi les Brachyura, dont *Callinectes sapidus* (Mangum et al., 1991) et *Callinectes aestuarii* (Dainese et al., 1998), les deux états d'agrégation sont présents.

Il existe un équilibre dynamique entre les formes d'association de l'Hc des crustacés (Mangum et al., 1991; Molon et al., 2000). Cet équilibre va être influencé selon les conditions du milieu. Chez un certain nombre d'espèces, il a été démontré *in vitro* que la dissociation complète des formes associées peut être obtenue à pH alcalin (pH > 9.0) en supprimant les cations divalents (Ca²⁺) par l'EDTA (Olianis et al., 2006; Paoli et al., 2007).

De plus, ce phénomène peut être réversible si les conditions initiales sont rétablies (conditions physiologiques), en particulier lorsque les sous-unités sont homogènes (Jeffrey et al., 1976; Stöcker et al., 1988; Dainese et al., 1998; Molon et al., 2000). Dans le cas où les sous-unités sont hétérogènes, la réassociation en hexamère est réversible. Cependant, la réassociation en dodécamères peut être partielle ou non réversible (Dainese et al., 1998; Olianas et al., 2006).

L'arrangement de différentes sous-unités au sein des Hcs joue un rôle principal dans l'association des hexamères. Des études *in vivo* et *in vitro* ont révélé que la présence d'un seul type de sous-unité peut limiter l'état d'association à l'hexamère (Markl, 1986). Le ratio dodécamère/hexamère dans l'hémolymphe de chaque espèce varie selon le ratio des sous-unités disponibles (Mangum, 1994). Chez certaines espèces, la formation de dodécamères dépend de la présence d'un pont disulfure inter-hexamère reliant une sous-unité spécifique de chaque hexamère associé (Murray et Jeffrey, 1974; Jeffrey et al., 1976; Stöcker et al., 1988).

1.1.4 Glycosylation des hémocyanines

La majorité des Hcs sont des glycoprotéines. Cependant, il existe d'importantes différences de teneurs en glucides et de compositions en monosaccharides entre les arthropodes et les mollusques (Van Kuik et al., 1990; Markl et al., 1976). La teneur en glucides des Hcs d'arthropodes est généralement faible (0,1-2%, p/p), alors que chez les mollusques, elle est plus élevée (2-9%, p/p). Le D-Mannose (Man) et le N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc) sont les unités glucidiques généralement retrouvées. Les mollusques renferment des unités glucidiques plus particulières. Par exemple, des unités D-Mannose, D-Galactose, D-Fucose, D-Xylose, N-Acétyl-D-Glucosamine, 3- et 4-O-méthyl-D-Galactose ont été retrouvées sur les Hcs de l'escargot terrestre *Helix pomatia* (Lommerse et al., 1975; Lommerse et al. 1997), du gastéropode marin *Rapana thomasiana* (Stoeva, 1995), et du mollusque marin *Megathura crenulata* (Stoeva et al., 1999). La partie glucosidique des Hcs de mollusques a suscité beaucoup d'intérêt pour leurs propriétés immunostimulantes (Harris and Markl, 2000).

1.1.5 Propriétés biologiques de l'hémocyanine

1.1.5.1 Activité phénoloxydase et mélanisation

Chez la plupart des arthropodes, l'Hc est produite dans l'hépatopancréas puis libérée dans le plasma (hémolymphe) pour assurer son rôle de transporteur d'oxygène. Cependant, cela ne semble pas être son unique fonction, puisque des découvertes récentes indiquent que l'Hc serait aussi impliquée dans la défense contre les parasites et dans la cicatrisation. En effet, après une blessure ou une infection, une pigmentation sombre apparaît progressivement au niveau des lésions des arthropodes. Ce phénomène, appelé mélanisation, serait expliqué par l'activité phénoloxydase (PO) de l'Hc, qui serait responsable de l'oxydation de substances phénoliques en mélanine noire (Kusche et al., 2002; Sanchez et al., 1998). De plus, il a été démontré chez les arthropodes que l'Hc, initialement sous forme d'une prophénoloxydase (ProPO), peut être fonctionnellement convertie en PO (oxydoréductase), via une activation en présence de trypsine (sérine protéase) ou de perchlorate ou dodécylsulfate de sodium (SDS), pour donner de la mélanine (Adachi et al., 2002; Salavto et al., 1998; Zlateva et al., 1996) (Figure 6). Du point de vue structural et fonctionnel, les hémocyanines d'arthropodes sont très proches des phénoloxydases puisqu'elles ont démontré une activité PO sur des substrats odiphénoliques (ie. L-DOPA) suite à différents traitements tels qu'une exposition aux détergents ou aux sels (Decker et al., 2001; Zlateva et al., 1996; Pless et al., 2003).

Récemment, l'activité PO de l'Hc isolée d'une crevette *Penaeus japanicus* a été observée *in vitro* par l'ajout de β 1,3-glucanes et de lysats hémocytaires (Adachi et al., 2003). La voie de biosynthèse de la mélanine noire est impliquée aussi bien dans les processus de sclérose et de cicatrisation des blessures que dans les réactions de défense contre les microorganismes envahissant l'hémolymphe (Sugumaran,1996; Ratcliffe et al., 1985; Söderhäll, 1982).





1.1.5.2 Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'Hc peut être initiée de 2 façons. Dans le premier cas, des peptides antimicrobiens peuvent activer l'activité phénoloxydase de l'Hc. Dans le deuxième cas, l'Hc peut être hydrolysée pour produire une source de peptides antimicrobiens (Decker et Jaenicke, 2004).

1.1.5.2.1 Peptides antimicrobiens activateurs de l'hémocyanine

Des peptides antimicrobiens secrétés à partir de cellules de l'hémolymphe (hémocytes) de la limule orientale (*Tachypleus tridentatus*) ont des structures amphiphiles pouvant initier l'activité phénoloxydase de l'Hc via l'interaction chitine-peptide-Hc (Nakamura et al, 1988 ; Kawano et al., 1990 ; Kawabata et al., 1996 ; Nagai et al., 2000). Parmi ces peptides, on retrouve la tachyplesine, un peptide antimicrobien associé à l'hémocyanine avec une constante de dissociation $K_D = 3.4 \mu M$. D'autres peptides antimicrobiens, dont la tachystatine, la tachycitine et la défensine, peuvent aussi provoquer une activité phénoloxydase au niveau des sous-unités de l'Hc de la limule orientale (Decker et Jaenicke, 2004).

1.1.5.2.2 Hémocyanine : source de peptides antimicrobiens

Plusieurs peptides ont été détectés dans l'hémolymphe de certains crustacés dont la crevette blanche d'Amérique latine, *Penaeus vannamei* (PvHCt), la crevette bleue, *Penaeus stylirostris* (PsHCt1, PsHCt2) (Destoumieux-Garzon et al., 2001), et l'écrevisse de Californie, *Pacifastacus leniusculus* (Astacidine) (Lee et al., 2003). Dépendamment des espèces, ces peptides ont révélé des propriétés fongicides (*P. vannamei*, *P. stylirostris*) ou bactéricides (*P. leniusculus*).

Les études d'analogie de séquence de ces peptides antimicrobiens démontrent qu'ils sont des produits issus de la protéolyse de l'Hc (Figure 7). D'autres peptides antimicrobiens, les penaeidines, sont produits par les hémocytes et libérés dans l'hémolymphe en réponse à une stimulation du système immunitaire ou lors d'infections par une bactérie pathogène. Ces peptides ont été largement étudiés à ce jour (Munoz et al., 2004, Yang et al., 2003; Munoz et al., 2002; Destoumieux et al., 1999; Destoumieux et al.,1997). De tels peptides trouvent leur application pour la prévention et le traitement de différentes maladies microbiennes, dans des secteurs très variés, en particulier dans les domaines de la santé et de l'agriculture, et dans celui de l'aquaculture, pour limiter le développement de maladies infectieuses dans les élevages (Roch et al., 2005).



Figure 1.7 Peptides antimicrobiens de l'extrémité C-terminale de l'Hc de crustacés. (A) La structure de l'Hc de *Panulirus interruptus* est utilisée comme modèle. Le domaine 3 est coloré en brun, les peptides PsHCt 1 et 2 sont colorés en vert et le peptide PvHCt et l'Astacidine en bleu. (B) Localisation des séquences peptidiques sur la surface de l'hexamère d'Hc. (C) La structure potentielle de PsHCt 1 et 2. Les acides aminés polaires sont en rouge, et les non-polaires en vert. Les acides aminés identiques polaires sont en rouge foncé, les non polaires identiques en vert foncé, et les acides aminés différents en gris. (D) La structure potentielle de PvHCt, mêmes couleurs qu'en (C). (E) La structure potentielle de l'astacidine 1, mêmes couleurs qu'en (C) (Decker et Jaenicke, 2004).

1.1.6 Propriétés immunostimulantes

Les Hcs de mollusques suscitent depuis plusieurs années un intérêt fondamental, mais également un intérêt en vue d'applications thérapeutiques (Herskovits et Hamilton 1991; van Holde et al., 1992). L'exemple le plus étudié est la KLH du mollusque marin

Megathura crenulata, qui a démontré des propriétés immunostimulantes et un potentiel thérapeutique des plus intéressants (McFadden et al., 2003; Tzianabos, 2000).

Dû à son efficacité élevée et sa toxicité minimale, l'hémocyanine à des fins thérapeutiques représente actuellement un très grand engouement pour des applications biomédicales comme les traitements anticancéreux. Lorsqu'elle est injectée à l'homme, le système immunitaire répond non seulement en attaquant la protéine, mais aussi en détruisant la tumeur. Il y a plus de 30 ans, Olsson et al. (1974) ont injecté 5mg de KLH à chacun de leurs patients et ont observé une réduction marquée de la prolifération des tumeurs de la vessie. Lamm et al. (2000) ont aussi observé que la KLH agit contre les cellules tumorales MBT-2 en réduisant leur croissance, et par conséquent, permet de prolonger la survie chez les souris. Plusieures études ont démontré aussi des propriétés thérapeutiques de l'hémocyanine de Megathura crenulata contre d'autres types de cancers, dont le cancer du sein, de la prostate, du pancréas, (Riggs et al., 2002) et de l'adénocarcinome œsophagien de Barrett (McFadden et al., 2003). Le mécanisme d'action de l'hémocyanine implique un effet immuno-modulateur sur plusieurs types de cellules du système immunitaire, résultant en une mort des cellules tumorales (Tzianabos, 2000). Certaines particularités structurales de la KLH, dont la grande taille, mais aussi la présence d'un oligosaccharide portant une unité galactose liée en β -1,3 au N-acétyl-galactose, seraient essentiels dans son efficacité en tant qu'agent immuno-thérapeutique (Harris et Markl 1999, 2000; Kurokawa et al., 2002; Wuhrer et al., 2004).

1.1.7 Propriétés immunogènes

Les excellentes propriétés immunostimulantes de la KLH sont reliées à son fort potentiel immunogène (aptitude à stimuler la production d'anticorps) (Burke et al., 1977; Moroz et al., 1973). Depuis cette découverte, la KLH est devenue l'une des protéines les plus utilisées en biotechnologie et dans le domaine biomédical, comme protéine porteuse de haptènes pour le développement de vaccins ou agents immuno-thérapeutiques contre certains types de tumeurs cancéreuses (Curtis et al., 1970, 1971; Herscowitz et al., 1972; Swanson et Schwartz, 1967).

L'hémocyanine est aussi utilisée comme protéine porteuse dans des thérapies antimicrobiennes, le contrôle immunologique d'hormones reproductives, et le traitement de maladies auto-immunes (Harris et Markl, 1999).

Les haptènes sont des substances non-immunogènes de faible taille moléculaire nécessitant l'aide d'une protéine porteuse pour stimuler une réponse immunitaire via la production d'anticorps spécifiques (Harris et Markl, 1999). La forte propriété immunogène de la KLH est expliquée par sa très grande taille moléculaire impliquant des états d'agrégation de l'ordre de 4.5 MDa à 13 MDa (van Holde et al., 1982; 1992). D'autre part, son abondance en résidus lysine pour le couplage des haptènes permet d'obtenir un haut ratio haptène:protéine porteuse, augmentant la probabilité de générer des anticorps spécifiques à l'haptène (Harris et Markl, 1999). La présence d'unités glycosidiques sur la KLH permet aussi de lier certains haptènes pour le traitement de certains types de cancer (Moltedo et al., 2006).

1.1.8 Sources disponibles d'hémocyanine

Le mollusque marin *Megathura crenulata* d'où la KLH est extraite a été le sujet de préoccupations pour les biologistes des pêches de l'État de la Californie en raison des risques d'une surexploitation de cette espèce à des fins commerciales (Parnell et al., 2004; Rapport du Marine Science Institute, 2006). Bien que certaines entreprises font actuellement l'élevage de cette espèce en vue d'extraire la KLH, une importante baisse de la population a été rapportée (Bushing, 2004). Par ailleurs, le mollusque chilien *Concholepas concholepas* est aussi surexploité à des fins commerciales pour l'extraction de l'Hc (CCH) (Petrova et al., 1996). Avec cette source d'Hc, des études ont démontré une forte réponse immunitaire à médiation cellulaire, une baisse da la croissance de tumeurs, une survie prolongée et l'absence d'effets toxiques chez des souris traitées à la CCH (Moltedo et al., 2006). Cette protéine pourrait donc être une alternative à la KLH en immunothérapie contre certains types de cancer chez l'humain (vessie, prostate) (Moltedo et al., 2006). La CCH se distingue par sa grande stabilité et sa solubilité. Dans les conditions physiologiques normales, la molécule consiste en un complexe didécamérique de l'ordre de 8 MDa constitué de sous-unités de 400 et 350 kDa.

Cette grande taille serait responsable des fortes propriétés immunogènes de la CCH (Weigle, 1964). La limule *Limulus polyphemus* est aussi une source d'extraction de l'hémocyanine (LPH) à des fins commerciales. Cette espèce est cependant menacée non seulement à cause de la surpêche, mais aussi par la pollution environnementale (Burger et al., 2002). Cela justifie donc la nécéssité de trouver de nouvelles sources plus abondantes d'Hc aux propriétés comparables.

1.1.8.1 Préparations d'hémocyanines commerciales disponibles

Quelques entreprises produisent et commercialisent des préparations d'hémocyanines de sources diverses à des fins thérapeutiques, ces préparations étant généralement sous forme de solutions ou lyophilisées. Parmi celles-ci, Biosonda Corp. (Santiago, Chili) a commercialisé le BLUE CARRIER[®], une solution d'hémocyanine purifiée à partir de l'hémolymphe du mollusque chilien *Concholepas concholepas* (CCH). Le BLUE CARRIER[®] est actuellement utilisé comme protéine porteuse pour le développement d'anticorps monoclonaux et polyclonaux contre divers types d'haptènes (molécules synthétiques et peptides). Site web de la compagnie : (www.biosonda.com).

Stellar Biotechnologies Inc. (Californie) a la particularité d'avoir développé et optimisé avec succès une technologie de production aquacole de *Megathura crenulata* permettant de récupérer la KLH sans sacrifier les animaux. Pour ce faire, une quantité limitée d'hémolymphe est retirée périodiquement des mollusques à l'aide d'une seringue pour les conserver en bonne santé. Le contrôle des conditions en bassins d'élevage permet un approvisionnement constant de qualité constante à des fins d'applications thérapeutiques. Les préparations de KLH purifiées sont commercialisées par l'entreprise Biosyn Corp. (Carlsbad, CA) sous les marques VACMUNE[®] et IMMUCOTHEL[®]. Site web de ces entreprises : (www.stellarbiotechnologies.com) et (www.biosyncorp.com). Pour ce qui est de l'Hc de la limule (*Limulus polyphemus*), elle est disponible sous forme lyophilisée, et distribuée chez Sigma.

1.2 Crabe des neiges (Chionoecetes opilio)

1.2.1 Classification (Système Intégré d'Information Taxonomique)

Le crabe des neiges, *Chionoecetes opilio*, appartient à l'embranchement des arthropodes, et au sous-embranchement des crustacés et à la classe des malacostracés. Il fait parti de l'ordre des décapodes, dans la famille des oregoniidés et du genre *Chionoecetes*.

1.2.2 Provenance

Le crabe des neiges, *Chionoecetes opilio* (Fabricius, 1788), est une grosse araignée des mers froides, que l'on retrouve dans le nord-ouest de l'Atlantique (Québec, Terre-Neuve, Nouvelle-Écosse, etc.), dans le Pacifique nord de l'Alaska, aux Iles Kouriles et du Kamtchatka, ainsi que les mers de Béring, d'Okhotsk et du Japon (Slizkin, 1982; Bailey et Elner, 1989; Andersen, 1993).

Au Canada, le crabe des neiges est distribué à la grandeur des provinces de l'Atlantique (Terre-Neuve, Nouveau-Brunswick, Nouvelle-Écosse, Île-du-Prince-Édouard), ainsi qu'au Québec. Il vit généralement enfoui dans les fonds sableux ou vaseux, à des températures comprises entre -1 et 5°C. Dans le golfe du Saint-Laurent, on le retrouve habituellement à des profondeurs de 45 à 380 mètres (Tremblay, 1997).

1.2.3 Morphologie et développement

Le crabe mâle se distingue par une large carapace, pouvant atteindre 16.5 cm de diamètre, alors que chez la femelle, elle dépasse rarement 9.5 cm. Il se distingue aussi par la forme de son abdomen étroit, comparativement au large plastron de la femelle (Figure 1.8).



Figure 1.8 Morphologie du crabe mâle et femelle (Pêches et Océans Canada, 2003)

Selon Comeau et Conan (1992), la maturité sexuelle chez les mâles est atteinte après trois phases de développement majeures qui sont séparées par deux mues critiques. Ces trois phases sont appelées: (i) immature, (ii) juvénile et (iii) adulte (Sainte-Marie et al., 1995). Les mâles immatures subissent une première mue critique menant à la phase juvénile (Sainte-Marie et al. 1995), mue qui est marquée par le début de la production de sperme et qui est suivie par une légère augmentation du taux de croissance des pinces relativement à la carapace (Comeau et Conan 1992). Ensuite, les crabes juvéniles mâles subissent une deuxième mue critique, la mue terminale, qui est marquée par la différenciation des pinces qui résulte en une croissance disproportionnée de celles-ci par rapport à la carapace (Conan et Comeau, 1986). La taille de la carapace des mâles adultes varie entre 38 et 162 mm (Sainte-Marie et al. 1995). Dans l'est du Canada, la majorité des mâles qui atteignent la mue terminale le font entre la fin de l'hiver et le début de l'été (Moriyasu et al., 1987; O'Halloran et O'Dor, 1988; Comeau et al., 1991; Sainte-Marie et Hazel, 1992). L'espérance de vie du crabe se situerait entre 5 et 6 ans après cette mue terminale (CQVB, 2005).

Avant d'atteindre la maturité sexuelle, les femelles passent par trois phases distinctes de développement : i) immature, ii) pré-pubère et iii) adulte (Alunno-Bruscia et Sainte-Marie, 1998). Ces trois phases de développement sont typiques des crabes Majidés et sont caractérisées par des attributs morphologiques et physiologiques différents visibles au niveau des caractéristiques sexuelles secondaires, du développement des ovaires et de la croissance de la carapace à la mue (Alunno-Bruscia et Sainte-Marie, 1998). L'abdomen des femelles immatures et pré-pubères est étroit, ce qui indique un état non-reproducteur tandis que les femelles matures ont un abdomen très large (Sainte-Marie, 1993).

1.2.4 Industrie de la transformation du crabe des neiges au Canada

La pêche du crabe des neiges au Canada a connu un essor remarquable au cours de la dernière décennie, les débarquements augmentant d'environ 25,000 tonnes en 1990 jusqu'à un peu plus de 93,000 tonnes en 2000 (Dufour et Sainte-Marie, 2001). Cet essor reflète principalement une hausse importante de l'effort de pêche sur les côtes de Terre-Neuve et du Labrador, sous-tendue par une augmentation importante de l'aire de distribution et de l'abondance du crabe des neiges, elle-même attribuable à une expansion de la surface des fonds baignés par la couche intermédiaire froide et à une diminution des prédateurs naturels (notamment la morue) à partir du milieu des années 1980 (Sainte-Marie et Gilbert, 1998).

La saison de pêche au crabe des neiges s'étend sur une période de 10 à 12 semaines en moyenne, soit du début avril à la fin juin. Puis survient une période de mue. La nouvelle carapace molle et fragile rend les crabes vulnérables et se prête mal à la transformation. L'abondance de ces crabes blancs entraîne parfois la fermeture prématurée de la saison de la pêche. D'une valeur au débarquement environ deux fois plus élevée que celle des poissons de fond, le crabe des neiges constitue l'une des espèces les plus nobles parmi les ressources marines canadiennes et se classe parmi les produits haut de gamme, tant sur les marchés intérieurs qu'internationaux (MAPAQ, 2004).
1.2.5 Coproduits de la transformation du crabe des neiges au Québec

Des estimations récentes sur la pêche du crabe des neiges au Québec indiquent que les volumes globaux de transformation, d'environ 13 mille tonnes, génèrent près de 4 mille tonnes de co-produits disponibles annuellement (MAPAQ, 2001; CQVB, 2005). D'après le Tableau 1.2, les usines transforment principalement le crabe des neiges en sections (les pattes) destinées pour le marché de l'alimentation. Le volume restant provient de crabes entiers (crabe crû et crabe cuit). Les co-produits sont constitués de l'hépatopancréas, le céphalothorax, la carapace et l'hémolymphe (liquide physiologique). Hormis la récupération faite par certaines usines de compostage, ces co-produits sont majoritairement rejetés ou enfouis, ce qui implique un important problème environnemental et économique.

Tableau 1.3Volumes destinés aux différentes lignes de transformation du crabe desneiges dans chaque région maritime du Québec (Source : CQVB, 2005).

Régions	Gaspésie	Côte-Nord	Îles-de-la-Madeleine	Total
Volume transformé (lbs)	14,363,000	10,800,000	3,541,000	28,704,600*
Section	78,9%	97,7%	76,7%	85%
Entier crû	9,1%	2,2%	8,9%	6-7%
Entier cuit	11,9%	0%	14,4%	8%

* Facteur de conversion : 2.2 (kg = lbs/2.2)

1.2.5.1 Biomolécules présentes dans les co-produits du crabe des neiges

Les co-produits du crabe des neiges ont récemment fait l'objet de plusieurs travaux de valorisation. À ce jour, diverses biomolécules à haute valeur ont été identifiées telles que les enzymes (collagénase), polysaccharides (chitine, chitosane), lipides (acides gras polyinsaturés, phospholipides), pigments, etc. (CQVB, 2005).

La valorisation des co-produits via l'extraction et l'enrichissement de ces biomolécules en vue de diverses applications est donc grandement envisagée. Les carapaces et l'hépatopancréas sont les principaux constituants retrouvés dans les co-produits issus de la transformation du crabe des neiges (Tableau 1.3). Parmi les constituants biochimiques retrouvés dans les carapaces et le céphalothorax, on retrouve une teneur intéressante en chitine (5,3 à 10,9 g/100g). Quant à l'hépatopancréas, sa composition en fait une biomasse de choix pour une valorisation des protéines (7,9 g/100g) et/ou lipides (5,2 g/100g). L'hépatopancréas du crabe des neiges pourrait aussi être une source intéressante de nombreuses enzymes digestives dont la collagénase (Yu et al., 1994; Grant et al., 1983), ainsi que la carbohydrase, chitobiase, β -galactosiadse, α -glucosidase, estérase et désoxyribonucléase (Brun et Wojtowicz, 1976). L'hépatopancréas présente aussi des concentrations intéressantes en acides gras polyinsaturés de type oméga-3, de l'ordre de 1 à 2 g/100g (CQVB, 2005).

1.2.5.2 Biomolécules actives présentes dans d'autres biomasses marines

Tout comme le crabe des neiges les crustacés (crevette, homard), les poissons (maquereau, hareng), et les algues représentent des ressources marines abondantes. La disponibilité de ces ressources et la demande croissante des marchés extérieurs pour des extraits/fractions de biomolécules marines en vue d'applications nutraceutiques, cosmétiques et pharmaceutiques justifient que les chercheurs s'y intéressent davantage. Chez les poissons, ce sont principalement les protéines (enzymes, collagène, peptides issus de l'hydrolyse) et les lipides (acides gras oméga-3, phospholipides) qui sont recherchés, dont l'importance varie selon l'espèce animale considérée. Les algues brunes ou vertes (laminaires et fucus) constituent une source abondante de polysaccharides, tels que le laminarane, l'alginate et le fucoïdane. Dans les coproduits issus de la transformation des crustacés (crabe, homard, crevette, krill), on retrouve de la chitine, des pigments (astaxanthine), des lipides (acides gras oméga-3, phospholipides), et des protéines (peptides issus de l'hydrolyse).

Tableau 1.4 Biomolécules actives disponibles dans les divers constituants des co-produits du crabe des neiges (CQVB, 2005)

Origine	Biomol	écules	Intérêts	Références
Carapace	Chitine	Chitosane	Biocompatible Cicatrisant Anticholestérolémiant Agent agglutinant, encapsulant, filmogène, épaississant. Propriétés ntimicrobiennes, antitumorales.	Kawabata et al., 1996
		Glucosamine Sulfate de chondroïtine	Intervient dans la régénération des cartilages articulaires	Punin Crespo et al., 2006
	Caroténoïdes	Bêta-carotène	Antioxydant	
		Astaxanthine	Antioxydant Pigmentation	Manu-Tawian et al., 1967
Hépatopancréas et		Collagénase	Cicatrisant	Sacharov et al., 1993; Klimova et Chebotarev, 2000
hémolymphe	Protéines	Phénoloxydase	Antimicrobien Cicatrisant	Söderhäll et al., 1998
		Hémocyanine	Immunostimulant Thérapeutique (anti-cancer)	Riggs et al., 2002

25

1.3 Réponse immunitaire

La réponse immunitaire peut se définir comme étant l'action intégrée des mécanismes développés par l'organisme afin de se défendre contre des éléments nocifs provenant de l'environnement. Ces mécanismes sont mis en jeu par l'ensemble des biomolécules et des cellules présentes dans les liquides physiologiques; elles communiquent entre elles via des médiateurs et des récepteurs. La capacité du système immunitaire à reconnaître les agents étrangers dans l'organisme se compose de deux types de réponses : la réponse non spécifique, naturelle ou innée et la réponse spécifique ou adaptative (Revillard, 2001; Chatenoud, 2002).

1.3.1 Immunité innée

La réponse innée est immédiate. Elle présente la première ligne de défense de l'organisme, mettant en jeu des protéines préformées, des signaux cellulaires d'activation et des médiateurs solubles de communication intercellulaire (cytokines). Par exemple, lors de la pénétration d'agents pathogènes dans la circulation sanguine, l'activation des cellules phagocytaires, notamment les macrophages, conduit à l'ingestion puis à la digestion de l'agent étranger, ainsi qu'à la production des cytokines qui, à leur tour, contribuent à l'induction de la réaction inflammatoire (Genetet, 1997; Revillard, 2001; Bach, 2002).

1.3.2 Immunité adaptive

La réponse adaptative ou spécifique représente la deuxième ligne de défense. Elle implique les lymphocytes B et T, portant à leur surface des récepteurs d'antigènes (Josien, 2002). Dans la réponse spécifique, les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale, en synthétisant des anticorps spécifiques aux antigènes. D'autre part, les lymphocytes T assurent l'immunité à médiation cellulaire et jouent un rôle essentiel dans la régulation des réponses immunitaires en produisant des cytokines. Une seule cytokine peut causer la stimulation de plusieurs autres cytokines dans une réaction en cascade (Chen et al., 1997).

Lors d'une infection, des molécules dérivant des pathogènes se fixent aux cellules présentatrices de l'antigène (CPA) en stimulant leur maturation et en dirigeant la différentiation des lymphocytes T en Th1 et Th2. D'autres molécules activent les CPA dirigeant l'induction des lymphocytes régulateurs (Tr). Le rôle des lymphocytes Th dans la réponse immunitaire est illustré dans la Figure 1.9. Lorsque le lymphocyte Th est stimulé, deux types de réponses sont activées: la réponse de type humorale (lymphocytes B) et la réponse de type cellulaire (lymphocytes cytotoxiques, les macrophages, les cellules tueuses, etc.). Les macrophages activés sont également capables de produire des cytokines interagissant avec d'autres cellules immunitaires (les cellules naturelles tueuses et granulocytes). Les cytokines jouent un rôle majeur dans la différentiation des cellules Th et la régulation des réponses immunitaires produites (Swain, 1993; Spellberg et Edwards, 2001).



Figure 1.9 Description schématique du fonctionnement de l'immunité induite par un antigène détecté. ADCC : cellules cytotoxiques dépendant des anticorps; Tr : Lymphocyte T régulateur; B : Lymphocyte B; Th, Lymphocyte T helper; CPA : cellules présentatrices de l'antigène; Tc : Lymphocyte T cytotoxique; NK : cellules naturelles tueuses; K : cellules tueuses (Kidd, 2003).

1.3.3 Médiateurs de l'inflammation

1.3.3.1 Cytokines

Lors de l'invasion par un pathogène, la production de cytokines est stimulée chez les macrophages, les cellules cytotoxiques et les cellules dendritiques. L'interleukine-10 (IL-10) représente une des plus importantes cytokines immunomodulatrices dans la réponse inflammatoire par sa capacité d'inhiber la synthèse de plusieurs médiateurs proinflammatoires comme le TNF α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, L'IL-4 et l'IL-13. Ceux-ci partagent avec l'IL-10 certaines activités inhibitrices de l'inflammation (Revillard, 2001; Bissonnette et al., 2004; VanDeusen et al., 2006). Le TNF α , une autre cytokine considérée comme essentielle dans la réaction inflammatoire, a des effets synergiques avec l'IFN γ . Excrété principalement par les macrophages, le TNF α exerce de multiples actions, dont la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-8, le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), etc.), ainsi que d'autres médiateurs de l'inflammation (l'oxyde nitrique (NO)) et la prostaglandine E₂ (PGE₂)) (Revillard 2001; Bissonnette et al., 2004).

1.3.3.2 Oxyde nitrique

L'oxide nitrique (NO) est un radical hautement réactif et instable qui joue un rôle important en tant que médiateur dans la régulation d'une multitude de processus physiologiques et physiopathologiques, dont l'immunité cellulaire, la neurotransmission et la vasodilatation. Le NO est synthétisé à partir de l'azote terminal du groupe guanidino de la L-arginine par l'action de l'enzyme NO synthase (NOS) (Yu et al., 1997; Achike et Kwan, 2003 ; Aktan, 2004). Il existe différentes formes de NOS dont une forme inductible NO synthase inductible (iNOS). En réponse à des stimuli pro-inflammatoires, dont l'interleukine-1 (IL-1), le facteur nécrosant tumoral alpha (TNF- α), les lipopolysaccharides (LPS) ou l'interféron gamma (IFN- γ), les macrophages et les cellules épithéliales produisent du NO (Kröncke et al., 2000). Après sa formation et sous des conditions aérobiques, le NO est rapidement oxydé, menant à la formation de produits instables, les «reactive nitrogen oxide species (RNOS)», dont le trioxyde de diazote (N₂O₃). Ces produits sont finalement hydrolysés et excrétés sous forme de nitrites (NO₂⁻) et nitrates (NO₃⁻).

1.4 Méthodes d'extraction, purification et caractérisation des hémocyanines d'arthropodes

1.4.1 Prélèvement et conservation de l'hémolymphe

Chez les arthropodes dont le crabe royal (*Paralithodes camtschatica*), l'hémolymphe peut être récolté à partir de spécimens vivants, via l'insertion d'une seringue à travers la membrane arthrodiale du joint proximal-médial se situant à la base de la quatrième ou cinquième paire de pattes. Environ 500 à 1000 ml d'hémolymphe peuvent être récoltés pour un spécimen de 3.5 à 5 kg (Chausson et al., 2001, Molon et al., 2000). L'hémolymphe est ensuite congelé en présence d'un agent cryoprotecteur tel que le glycérol, afin d'éviter la coagulation de l'Hc. L'ajout de tampon citrate permet aussi de prévenir la coagulation de l'hémolymphe (Beltramini et al., 2005). En ce qui concerne les préparations commerciales de KLH, elles sont généralement conservées lyophilisées ou en solutions réfrigérées.

1.4.2 Extraction et fractionnement de l'hémocyanine à partir de l'hémolymphe

Diverses approches ont été proposées pour l'extraction et le fractionnement de l'Hc, dont la centrifugation de l'hémolymphe suivie ou non par une étape de dialyse du surnageant contenant l'Hc (Chausson et al., 2001; Beltramini et al., 2005; Molon et al., 2000). La précipitation au sulfate d'ammonium s'est avérée efficace pour récupérer l'Hc (De Ioannes et al., 2004 ; Nakashima et al., 1985). Ce sel est connu pour avoir peu d'effet dénaturant et permettre de maximiser l'obtention des protéines biologiquement actives (Boyer, 1986; Dawson et al., 1986). Cependant, cette étape nécessite la redissolution du culot protéique suivie d'une étape de dialyse ou d'ultrafiltration permettant d'éliminer le sel résiduel. La diafiltration est une approche privilégiée car elle est plus simple et plus rapide.

1.4.3 Purification de l'hémocyanine

La chromatographie d'exclusion moléculaire a été largement utilisée pour la purification de l'hémocyanine de diverses espèces de crustacés (Adachi et al., 2005; Beltramini et al., 2005; Chausson et al., 2001; Molon et al., 2000; Figueroa-Soto et al., 1997; Mangum et al., 1991). La chromatographie d'échange anionique a surtout été utilisée pour purifier les sousunités de l'hémocyanine (Dolashka-Angelova et al., 2005; Molon et al., 2000; Gebauer et al., 1999).

1.4.4 Détermination de la taille moléculaire de l'hémocyanine et de ses sous-unités

La détermination de la taille moléculaire des états d'association de l'hémocyanine à l'état natif (hexamère, dodécamère) et l'abondance relative entre ces états furent généralement déterminées par chromatographie d'exclusion moléculaire et par électrophorèse (PAGE) en mode natif (Chausson et al., 2001; Figueroa-Soto et al., 1997). Pour les sous-unités, la taille moléculaire fut obtenue soit par chromatographie d'exclusion moléculaire en conditions dissociantes ou par électrophorèse SDS-PAGE (Chausson et al., 2001; Figueroa-Soto et al., 1997; Adachi et al., 2005). Des techniques plus sophistiquées permettant de déterminer de façon plus précise la taille moléculaire des formes associées ont aussi été utilisées, telles que la spectrométrie de masse (Chausson et al., 2001; Maddaluno et Faull, 1999).

1.5 Problématique et contexte du projet de recherche

L'hémocyanine est la protéine responsable du transport de l'oxygène dans le liquide physiologique (hémolymphe) d'un grand nombre d'invertébrés marins. Chez certains mollusques dont *Megathura crenulata et Concholepas concholepas*, l'efficacité élevée et la toxicité minimale de cette biomolécule marine à des fins thérapeutiques représentent actuellement un très grand engouement pour des applications biomédicales comme les traitements anticancéreux. Cependant, comme ces mollusques sont des ressources limitées ou menacées, l'élevage est nécessaire afin de permettre une exploitation commerciale d'hémocyanine, bien que cette approche soit onéreuse. Cela justifie donc l'intérêt d'explorer de nouvelles sources abondantes et peu coûteuses d'hémocyanine, dont les coproduits de la transformation des crustacés.

Au Québec, l'industrie de la transformation du crabe des neiges génère d'importants volumes de coproduits inutilisés. Ces derniers représentent une source intéressante de biomolécules à haute valeur (chitine, caroténoïdes, lipides, enzymes, protéines, peptides, etc.). Le développement de procédés d'extraction et de fractionnement de ces biomolécules est envisagé en vue de récupérer intégralement diverses fractions enrichies de ces biomolécules d'intérêt. Puisque les crustacés se caractérisent généralement par la présence d'hémocyanine dans l'hémolymphe (liquide physiologique), nous devrions donc retrouver cette biomolécule dans les coproduits de transformation du crabe des neiges, contenant ce précieux liquide. Aucune donnée n'a été rapportée à ce jour sur les caractéristiques et les propriétés biologiques de l'hémocyanine issue des coproduits du crabe des neiges.

1.6 Hypothèse et objectifs

1.6.1 Hypothèses

La chromatographie d'exclusion moléculaire permet de purifer l'hémocyanine à partir de l'hémolymphe de crabe des neiges.

L'hémocyanine de crabe des neiges a un effet immunostimulant.

1.6.2 Objectifs spécifiques

- Développer une procédure d'extraction et de purification de l'hémocyanine de crabe des neiges, à partir de l'hémolymphe.
- Caractériser l'hémocyanine.
- Évaluer son potentiel immunostimulant et le comparer aux préparations commerciales actuellement disponibles.

CHAPITRE II

Purification et caractérisation de l'hémocyanine du crabe des neiges, *Chionoecetes opilio*

Purification and characterization of hemocyanin from snow crab, *Chionoecetes opilio*

Résumé

L'hémocyanine (Hc) du crabe des neiges (*Chionoecetes opilio*) a été purifiée par chromatographie d'exclusion moléculaire à partir de l'hémolymphe et caractérisée. À l'état natif, elle est constituée d'un mélange de deux états d'association, dont le dodécamère (744 kDa; 31%) et l'hexamère (442 kDa; 69%). L'élimination des ions Ca²⁺ à pH alcalin entraine la dissociation réversible de ces agrégats. L'analyse SDS-PAGE de la forme dodécamère révèle une hétérogénéité des sous-unités, la principale ayant une taille moléculaire de 73 kDa. Cette sous-unité est la seule retrouvée au niveau de l'hexamère, où la focalisation du point isoélectrique révèle cependant deux points isoélectriques (à 5.7 et 4.6). D'autres analyses révèlent que l'Hc de crabe des neiges possède une activité phénoloxidase en présence de L-DOPA et que la présence d'unités glucidiques est non détectable avec le test à l'acide périodique-base de Schiff. Les caractéristiques de l'Hc du crabe des neiges sont généralement similaires à celles rapportées chez d'autres espèces de crustacés.

Mots clés : Hémocyanine; crustacés; purification; caractérisation; sous-unités

Abstract

Hemocyanin (Hc) from snow crab (*Chionoecetes opilio*) was purified from hemolymph by size-exclusion chromatography and characterized. In the native state, it is found as a mixture of two aggregation states, as the dodecamer (744 kDa, 31%) and the hexamer (442 kDa, 69%). Removal of Ca^{2+} ions at alcaline pH results in a reversible dissociation of those aggregates. SDS-PAGE analysis of the dodecamer reveals subunit heterogeneity, the main one showing a molecular weight of 73 kDa. This subunit is the only one found in the hexamer, where the isoelectric focalisation reveals two pI (at 5.7 and 4.6). Other analysis reveal that snow crab Hc has a phenoloxidase activity in the presence of L-DOPA and the presence of glycosidic linkages is undetectable with the periodic acid-Schiff base test. The characteristics from snow crab Hc are mostly comparable to those reported with other crustacean species.

Keywords: Hemocyanin, crustaceans, purification, characterization, subunits

2.1 Introduction

Hemocyanins (Hcs) are large multimeric copper-containing proteins, playing a role in oxygen transport and storage in the hemolymph of many arthropods and molluscs species (Markl and Decker, 1992; van Holde and Miller, 1995; van Holde et al., 2001; Burmester, 2002). In arthropods, Hcs are build up of hexamers consisting of about 75 kDa basic subunits, which can associate to form aggregates from $12 (2 \times 6)$ up to $48 (8 \times 6)$ subunits, resulting in quaternary organization oligomers of molecular masses from 450 to 3900 kDa (Markl and Decker, 1992; van Holde et al., 2001). Each subunit contains a binuclear copper site which could bind to an oxygen molecule. In the decapods, especially the crustacean (e.g. Paralithodes camtschaticae, Cyanagraea praedator, Panaeus monodon), the most common aggregation levels of native Hc are hexamers or dodecamers, or both (Molon et al., 2000; Chausson et al., 2001). In most cases, those aggregation states could be reversibly dissociated from the subunit structure by an appropriate choice of non-physiological solution conditions (removal of bivalent cations, increase of pH to 9.2) (Molon et al., 2000). In some crustaceans, Hc shows the largest extent of heterogeneity, with a great variety of subunits expressed within the same oligomeric protein and a wide degree of regulatory mechanisms (Giomi and Beltramini, 2007).

The carbohydrate content of arthropod Hcs is usually low (0.1 and 2%), and only D-Man and D-GlcNAc are detected (van Kuik et al, 1990). The Hc of the crab *Carcinus aestuarii* contains carbohydrate moieties corresponding to 1.6% of the protein mass (Dolashka-Angelova et al., 2001).

Multiple biological functions have recently been reported for arthropod Hcs of crayfish, *Pacifastacus leniusculus;* spiny lobster *Panulirus argus;* deepwater pink shrimp *Parapenaeus longirostris*, including antibacterial as well as phenoloxidase (PO) activity (Destoumieux-Garzon et al., 2001; Lee et al., 2003; Martínez-Alvarez et al., 2007). In some cases, it has been shown that Hc is a prophenoloxidase (PPO) which can be functionally converted into a PO, a key molecule in the host defence system, whose

functions are to detect and kill invading pathogens as well as to synthesize melanin for wound healing and pathogen encapsulation (Söderhäll and Cerenius, 1998).

The Snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae) (Fabricius, 1788), is found in the southwestern Gulf of St. Lawrence and is one of the most valuable fishery resource exploited in Atlantic Canada (Hébert et al., 1992). Although it is also found in the northern Pacific, the Bering Sea, the Arctic Ocean and the Sea of Japan, *Chionoecetes opilio* is one of the important species present in the Atlantic Ocean (Squires and Dawe, 2003). In the Gulf of St. Lawrence, it is mainly found at dephts varying from 45 to 380 m (Tremblay, 1997). The fishing season starts in the late April, ends in early May when the Gulf is clear of ice, and lasts approximately 10 to 12 weeks.

In the present study explores the purification and characterization of Hc from the snow crab hemolymph is presented, including the analysis of the aggregation states and subunit heterogeneity, the modulating effects of calcium and pH on the dissociation and reassembly of subunits, and the investigation of the presence of glycosidic groups and phenoloxydase activity with purified Hc.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Animal collection and hemolymph sampling

Living specimens of *C. opilio* (n=25) were purchased from a local market (Les Pêcheries Gaspésiennes Inc., Gaspé, Québec, Canada). They were caught in the North of the Gaspé peninsula (zone 12). They were kept in ice up to their transport to the laboratory the same day. After removing the leg sections, hemolymph was gently collected by draining, passed through a cheese cloth and maintained on ice. All the collected hemolymph (2.8 L) was pooled, mixed with glycerol (20%, w/v) as a cryoprotecting agent and mixed (19:1) with a stock solution of 400 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) (final concn. = 20 mM). Finally, it was kept at -80°C until used.

2.2.2 Hemolymph global composition analysis

Global composition analysis of hemolymph was done from the supernatant obtained after centrifugation at 10,000 x g for 20 minutes. Protein content was determined using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce). Lipid content was determined using methanol/chloroform extraction (Bligh & Dyer, 1959). Humidity was determined using Karl-Fisher method (AOAC, 1995), and ash content was obtained by heating sample overnight at 550°C. Glycogen and total sugars were determined using anthrone method with and without ethanol precipitation, respectively (Carroll et al., 1956).

Copper determinations were done from ashes using flame atomic absorption spectrometry (FAAS) (Spectra AA-220 FS, Varian). Hc-bound copper in hemolymph was obtained from acetone precipitation and washes (70%, v/v) prior to mineralization. Using the bound copper determination, Hc concentration was calculated using the following formula, assuming a copper-to-protein stoichiometry of 2.0 atoms of copper per mole protein and a molecular mass of 75 kDa for the reference value of subunit containing one active site for arthropods (Molon et al., 2000; Chausson et al., 2001).

 $[Hc] = \frac{[Cu]_{bound}(mg/L) \times Vol. Cu (ml) \times M_w Hc (g/mole) \times 1 \text{ mole Hc}}{Vol. \text{ sample (ml)} \times M_w Cu (g/mole) \times 2 \text{ moles Cu}}$

[Cu]bound (mg/L) x Vol. Cu (ml) x 75,000 (g/mole) x 1

Vol. sample (ml) x 63.546 (g/mole) x 2

Vol. Cu = volume of copper soln. for FAAS analysis. Vol. sample = sample volume (hemolymph) [Cu]_{bound} = Hc-bound copper concentration determined by FAAS. [Hc] = calculated Hc concn.

2.2.3 Protein purification

From the supernatant obtained after centrifugation of hemolymph at 10,000 x g for 20 minutes, a filtration step through GF/C filter paper (Whatman) was followed by a microfiltration step using a mixed cellulose ester membrane, 0.45 μm (Millipore). Gel-filtration chromatography of the permeate was then carried on a Hiload Superdex 200 16/60 preparative column (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) allowing a separation range between 10,000 to 600,000 Da. The column was equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 20 mM CaCl₂. It was calibrated using bovine serum albumin (67 kDa) (Sigma), aldolase (158 kDa), catalase (232 kDa), ferritin (440 kDa), and thyroglobulin (669 kDa) (HMW kit from GE Healthcare Bio-Sciences). The exclusion volume of the column was determined using blue dextran 2000. Proteins were monitored from the absorbance at 280 nm. A flow rate of 1 ml/min was maintained during purification.

2.2.4 Subunit dissociation and reassembly experiments

To identify the collected peaks as purified Hc, the following dissociation-reassociation treatments were done at 4°C, based on the known dependency of Hc aggregation states with changes of pH and bivalent cations concentration (Ca^{2+} or Mg^{2+}) (Molon et al., 2000). In the first treatment, dissociation of the aggregation states was performed in the presence of 10 mM EDTA (Ca^{2+} sequestrant) at pH 7.5 during 24h, followed by an increase of pH at 9.2 during 48h. In the second treatment, reassembly into upper aggregation states was performed by first decreasing pH to 7.5 during 24h, followed by replacement of EDTA with 20 mM CaCl₂ during 48h (Olianas et al., 2006; Paoli et al., 2007).

Samples obtained from each treatment were concentrated by ultrafiltration and injected in gel-filtration column as above, to compare the molecular weight distribution profiles at the different aggregation states. Each aggregation state condition was maintained using appropriate mobile phases such as 20 mM Tris-HCl with either 20 mM CaCl₂ or 10 mM EDTA, at pH 7.5 or 9.2.

2.2.5 Electrophoresis

To estimate the molecular weight of Hc subunits present in hemolymph and purified fractions, reducing SDS-PAGE was performed according to the classical procedure described by Laemmli (1970). This was done using NuPAGE[®] 4-12% Bis-Tris Gel with appropriate buffer kit (NP0060, Invitrogen). Gel was run at 150 V for 1h30 at room temperature. Protein standard marker was in the range of 10 to 250 kDa (Bio-Rad).

Molecular weight estimation of native Hc found in hemolymph and purified fractions was obtained from native-PAGE using NativePAGE^m Novex[®] Bis-Tris 3-12% Gel with appropriate buffer kit (BN2007, Invitrogen). Separation was performed at room temperature during 90 min at 200V. Native protein standard marker was in the range of 20 to 1200 kDa (LC0725, Invitrogen). In both electrophoresis, gels were stained with Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad).

Determination of protein isoelectric point in hemolymph and purified fractions was performed using Novex[®] pH 3-7 IEF gel with appropriate buffer kit (LC5377 Invitrogen). IEF was run for 3 hours by increasing the voltage gradually (from 100V to 500V) and maintaining the final focusing voltage for 45 min. Protein standard marker was in the range of pI from 3.5 to 10.7 (IEF Markers 3-10, SERVA Electrophoresis). Gel was stained with Bio-Safe Coomassie Stain (Bio-Rad). Xcell SureLock Mini-Cell system (Invitrogen) was used throughout electrophoresis experiments.

2.2.6 Glycoprotein detection

The glycoprotein detection kit (GLYCOPRO, Sigma-Aldrich) was used to assess the presence of glycosidic units on hemolymph and purified fractions of Hc. This method, designed for the selective labelling of glycoproteins on polyacrylamide gels, is based on a modification from the periodic acid-Schiff base method (Zacharius et al., 1969).

2.2.7 Assay for the determination of phenoloxydase activity

Hemolymph and purified fractions of Hc were tested for PO activity using the procedure reported by Kopacek et al. (1995) with L-DOPA (L- β -3,4-dihydroxyphenylalanine) (Sigma) as substrate. The reaction mixture containing purified native Hc (5 µg), or hemolymph (3.5 µg) or control was incubated in 10 mM Tris-HCl, pH 6.5 with 4 µg L-DOPA at 20°C. The replacement of water by 10 µl of 5 mg/ml chymotrypsin (Sigma) was also done to verify the presence of PPO activation, after 5 minutes of incubation at room temperature. Moreover, protease inhibitors were not added to the samples prior assays. The increase of absorbance at 490 nm was monitored continuously during 5 minutes. The unit of PO activity corresponded to the change of absorbance unit per minute (slope ΔA_{490} /min) (Terwilliger and Ryan, 2006), and was expressed per ml of protein sample (U/ml). The PO specific activity (U/mg protein) was calculated from the PO activity divided by the concn. of protein in sample (mg/ml). Results are mean values from duplicates ± S.D.

2.3 Results

2.3.1 Hemolyphm composition

The hemolymph composition of *C. opilio* is presented in table 2.1, where proteins, Hc, and ash were the main constituents found. Such a composition revealed that Hc content (19,08 g/L) represents 44.6% of total proteins, whereas Hc-bound copper (12,68 mg/L) represents more than 75.8% of the total copper found in hemolymph. The contents in glycogen, total sugars and lipids were lot much lower compared to proteins.

2.3.2 Hc purification

Gel-filtration chromatography from *C. opilio* hemolymph revealed the presence of two peaks in the native conditions (pH 7.5, presence of Ca^{2+}) (Figure 2.1a, solid line). The first peak eluted corresponded to the dodecameric state of Hc, whereas the second peak corresponded to the hexameric state. The hexameric peak was the largest one.

The estimated calculated surface area of both peaks indicated a proportion of 31.4% of dodecamers and 68.6% of hexamers.

The molecular weight of those aggregation states corresponded respectively to 744 kDa and 442 kDa. No other protein component was found in the separation range of the Hc components, indicating a high degree of purity obtained from this purification method. It also revealed that most of the protein composition recovered from hemolymph was Hc.

However, it worth to mentioning that isolation of each aggregation state was limited by an incomplete peak resolution obtained from the gel-filtration column. Therefore, the peaks were collected in the following way: the mixture of both peaks (dodecamer with hexamer) collected together was named "native Hc", the first peak collected from the beginning to the top was named "dodecamer", and the second peak collected from the top to the end was named "hexamer". Those purified fractions were used for characterization experiments.

2.3.3 Dissociation-reassociation experiments

To verify the identity of the previous peaks as dodecameric and hexameric components of Hc, dissociation experiments were done from the native Hc collected at pH 7.5 in the presence of Ca^{2+} ions (fig. 2.1a, solid line). After Ca^{2+} ions sequestration by the addition of 10 mM EDTA, a partial dissociation of the dodecameric state into hexameric state was observed after 24h (data not shown). Increasing pH to 9.2 resulted in a complete dissociation of the dodecamer and monomer after 24 h, where the retention time of the monomeric peak corresponded to a molecular weight of 70 kDa (fig. 2.1a, dashed line). A longer time of exposure at pH 9.2 resulted in a complete dissociation towards a monomeric peak (data not shown).

After the monomeric fraction was collected and kept overnight (24h) under reassociating native conditions (pH 7.5, presence of Ca^{2+}), the hexameric state was recovered and monomeric state partially decreased (fig. 2.1b, solid line). After a longer period of reassociation (24h), both hexameric and dodecameric states were almost fully recovered as in initial native conditions, and the monomeric state was almost completely disappeared,

indicating a full reversibility of the reassociation process (fig. 2.1b, dashed line). The dissociation-reassociation behaviour of the native peaks was clearly in agreement with the pH and bivalent cation dependency of Hc aggregation states, which confirmed the presence but also the purity of the dodecameric and hexameric states of Hc from *C. opilio*.

2.3.4 Electrophoresis analysis

Figure 2.2 shows the SDS-PAGE of *C. opilio* hemolymph and collected hexamer and dodecamer fractions obtained from gel-filtration chromatography. It revealed that the hexamer fraction contained only a single subunit band with a molecular weight of 73 kDa, corresponding to the monomer. The same band was also the major one found in hemolymph and dodecamer fractions, which contain minor bands of slightly higher molecular weight, especially the dodecamer fraction. This revealed a subunit heterogeneity in the dodecameric state. Hemolymph and dodecamer fraction also contained a band at 150 kDa that would be explained by an incomplete dissociation of subunits (presence of residual dimers).

Figure 2.3 shows the native PAGE of *C. opilio* hemolymph and native Hc and hexamer fractions obtained from gel-filtration chromatography. For any of those fractions, the two major bands observed at 466 kDa and 715 kDa would respectively correspond to the hexameric and dodecameric aggregation states from Hc. Those results confirm well with the previous results obtained from gel-filtration chromatography. With native Hc and hexamer fractions, a triad of close minor bands were also observed at higher molecular weights, especially with the native Hc fraction. This suggests the formation of a higher aggregation state than dodecamer in those conditions, which could not be observed with gel-filtraction chromatography.

The isoelectric focussing (IEF) was done on hemolymph, purified native Hc, dodecamer and hexamer fractions from C. *opilio* (Figure 2.4). The hexamer reveals two bands of isoelectric points at 4.6 and 5.7, whereas the native Hc reveals the various bands obtained with both dodecamer and hexamer.

Those results revealed a small structural heterogeneity in hexamer, which cannot be observed from SDS-PAGE and native PAGE results. Therefore, this type of heterogeneity could not be related to the molecular weight heterogeneity, as found in native PAGE for native Hc fraction.

2.3.5 Glycoprotein content

The glycoprotein detection test revealed negative results in hemolymph as well as purified Hc fractions (Native, dodecamer and hexamer) (results not shown). Thus, under conditions of the glycoprotein detection kit, the hemocyanin from *C. opilio* is not a glycosylated protein.

2.3.6 Phenoloxidase activity

Phenoloxidase (PO) activity of hemolymph (10 mg/ml) and purified native Hc fraction (14 mg/ml) from *C. opilio* was tested using L-DOPA as substrate (Table 2.2). Preliminary tests with native Hc in the presence of an activator (chymotrypsin) before reaction with L-DOPA revealed a comparable activity without prior exposure with this activator, indicating that *C. opilio* Hc is already a PO. However, it worth to recall that protease inhibitors were not added to samples before assays.

The L-DOPA assay with hemolymph and native Hc revealed that both preparations were concentrated enough to produce a detectable PO activity. However, the activity in native Hc (0,18 U/ml) was higher than in hemolymph (0,04 U/ml). Specific activity in native Hc (0,013 U/mg) was also higher than in hemolymph (0,004 U/mg). Control measurements without Hc or hemolymph showed no oxidation of L-DOPA.

2.4 Discussion

2.4.1 Hemolymph composition

From the hemolymph composition of *C. opilio*, the calculated Hc/protein ratio (45%) was similar to the reported value (48%) with vent crab, *Cyanagraea praedator* (Chausson et al., 2001). However, it was a lot much lower compared to most of other arthropods, where Hc could represent up to 80-95% of total proteins in hemolymph (Jeuniaux, 1971). It is also worth mentioning that Hc concentration determinations were based on functional Hc measurements, without considering the potential presence of apo-Hc (Hc without bound-copper). In some cases, the apo-Hc would represent a relatively important part of the total protein content (Chausson et al., 2001).

Most of the copper ions found in *C. opilio* hemolymph (> 75%) occurred as bound with Hc, as explained by the large number of copper ions bound with Hc, and the relatively high concentration of this protein in the hemolymph of many species (Engel and Brouwer, 1990). Moreover, the copper bioaccumulation phenomena seem to be present in molluscan species such as *Neomphalus fretterae* (Cosson, 1996) and *Chorocaris chacei*, an Atlantic shrimp (Chausson, 2001). The low sugar concentration found in *C. opilio* hemolymph was similar to the one found in the shrimp *Macrobrachium rosenbergii* (Soria et al., 2006). In the hemolymph of crustaceans, variations in proteins, Hc, copper and carbohydrates concentrations were shown to induce transitory metabolic adaptations along the molt cycle and seem to influence the immunological status of crustaceans (Engel and Brouwer, 1990; Agundis et al., 2000; Fuji-more and Abe, 2002; Pascual et al., 2004).

2.4.2 Purification of Hc

Purification of native *C. opilio* Hc revealed that its structure was a mixture of hexamers and dodecamers, where the predominant form was the hexamer. This is in accordance with observations from other native crustacean Hcs, where the most common aggregation states of native Hc are either hexamer, dodecamer, or both (Molon et al., 2000; Chausson et al., 2001; Beltramini et al., 2005; Olianas et al., 2006).

In the case of *Astacus astacus*, the dodecamer/hexamer ratio could be shifted by adaptation to different temperatures (Decker and Foll, 2000). This structural and functional plasticity is believed to play an important role in the physiological adaptation of crabs to environmental changes (Terwilliger, 1998).

Using gel-filtration chromatography as well as native PAGE techniques, the molecular weights calculated for dodecamer were not corresponding to the twice of the hexamer. This observation was also done in previous studies (Chausson et al., 2001). Those techniques are based on determinations of the molecular size rather than molecular mass. The non-proportionality would be explained by the geometrical change of the aggregate from hexamer to dodecamer, which would change from spherical to elongated, as suggested by the modeling study of Hc associated states from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* (Martin et al., 2007). More specific techniques such as MALDI-TOFF or ESI-MS would have to be used to determine more exactly the molecular mass of each associated state, including the monomer.

2.4.3 Dissociation and reassembly of Hc

Dissociation-reassociation experiments results showed that the aggregation states of *C. opilio* Hc were governed by both pH and Ca^{2+} ions, in agreement with most of other kinds of arthropod Hcs, known to be dissociated into subunits under nondenaturating conditions by removing divalent cations Ca^{2+} or Mg^{2+} with EDTA and by increasing the pH (Miller and van Holde, 1974; Molon et al., 2000). Moreover, the *C. opilio* Hc revealed a complete reversibility of the native state after reassociation. Usually, the dissociation of crustacean Hcs is a process that is not fully reversible. Long ago, many researchers failed in attempts to reconstitute 2x6-meric structures, particularly in the case of *Brachyuran crabs* (van Holde and Miller, 1982), but fully native restoration came with the fresh water crayfish *Astacus leptodactylus* (Stöcker et al., 1988). The complete reassembly of native Hc requires three main conditions, as the presence of each isolated subunit, a physiological pH and the presence of Ca^{2+} ions. Another important consideration is the presence of a favourable chemical equilibrium between the hexameric and dodecameric states (Molon et al., 2000).

As observed during dissociation-reassociation experiments with *C. opilio* Hc, such equilibrium between two forms would be very quick to meet, which would limit the isolation of hexamer vs. dodecamer.

2.4.4 Subunit hetorogeneity

SDS-PAGE results provided a clear indication of the molecular weight heterogeneity among the monomers (subunits) that constitute the dodecamer fraction of *C. opilio* Hc, whereas hexamer fraction only indicated isoelectric point heterogeneity. The heterogeneity from specific Hc subunits ("linker" subunits) has been shown to be necessary in the formation of aggregation states of crustacean Hcs above that of the hexamer, as in the case of *Cancer pagurus, Maja squinado, Astacus leptodactylus* (Markl et al, 1979) and *Callinectes sapidus* (Johnson et al., 1984). However, a single type of subunit was shown as adequate for the correct reassembly of the basic hexamer unit (Bijlholt et al., 1979; Brenowitz et al., 1983). The heterogeneity would also be interpreted as a result of physiological adaptation to sudden environmental changes (Bellelli et al., 1988; Mangum et al., 1988).

2.4.5 Detection of glycosidic units

The absence of glycosidic units found in Hc fractions from *C. opilio* revealed that it was not a glycoprotein, by opposition to other types of Hcs that contain it (Dolashka-Angelova et al., 2001; van Kuik et al, 1990). The detection limit of the method under 25-100 ng of glucidic groups, depending on the protein's nature and degree of glycosylation, would justify the use of a more sensible method for glycoprotein detection, as the MALDI-MS (Dolashka-Angelova et al., 2001) to verify those results.

2.4.6 Phenoloxidase activity

Results of phenoloxidase (PO) assay using L-DOPA oxidation revealed that Hc from *C. opilio* have a phenoloxidase activity, without a need of prior activation with trypsin. Results

have shown more than 3-fold increase of specific activity in native purified Hc compared with hemolymph.

According to the global composition of hemolymph where Hc represents up to 45% of total proteins, the purification by itself would just allow a 2,2-fold increase of specific activity. Therefore, compared to the native purified Hc, the lower PO specific activity obtained with hemolymph could also be due to the presence of an inhibitors or PO interfering subtances, as suggested by Nellaiappan and Sugumaran (1996) with hemolymph from *Limulus polyphemus*.

The source of PO activity differs among the various groups of arthropods. In insects, shrimp, and crayfish, the PO activity mainly originates from a prophenoloxidase (PPO) protein found in the hemocytes (Aspán and Söderhäll, 1991). In some crustaceans, freely circulating extracellular hexamers and multihexamers of Hc in the hemolymph could be activated from PPO to PO (Decker and Jaenicke, 2004). In certain other crustaceans and in chelicerates, PO activity in the hemolymph appears to be only due to the extracellular Hc, since no *o*-diphenolase activity has been observed in hemocytes (Decker et al., 2001; Pless et al., 2003). These overlapping differences in source of PO are intriguing, in part because they do not fall into a strictly phyletic pattern, and they stimulate questions about the evolution of Hc and PO. The PO activity of Hc could also be a residual function maintained in the molecule's structural history and demonstrated only in a laboratory setting (Nellaiappan and Sugumaran, 1996; Decker et al., 2001; Pless et al., 2003).

2.5 Conclusions

Purification of native *C. opilio* Hc revealed a mixture of two aggregation states, as the dodecamer (744 kDa, 31%) and the hexamer (442 kDa, 69%). Removal of Ca^{2+} ions at alcaline pH results in a reversible dissociation of those aggregates. SDS-PAGE analysis of the dodecamer reveals subunit heterogeneity, the main one showing a molecular weight of 73 kDa. This subunit is the only one found in the hexamer, where the isoelectric

focalisation reveals two pI (at 5.7 and 4.6). The characteristics from snow crab Hc are mostly comparable to those reported with other crustacean species.

Acknowledgements

The financial support from Innovation and Technologies Directorate (DIT-MAPAQ) and the Gaspésie-Les Iles Community Foundation (FCGI) are gratefully acknlowledged.

Biochemical parameters	Mean	±s
Proteins (g/l)	42.79	0.99
Hemocyanin (g/l)	19.08	0.02
Hc copper (mg/l)	12.68	0.26
Total Copper (mg/l)	16.73	0.27
Glycogen (g/l)	0.31	0.03
Total sugars (g/l)	2.70	0.22
Lipids (g/l)	1.13	0.23
Ash (g/l)	20.92	0.16
Density	1.08	*

 Table 2.1 Biochemical composition of hemolymph from Chionoecetes opilio

1 able 2.2 Phenoloxidase acti	ity of Hc preparations from C.	opilio (L-DOPA oxidation).
-------------------------------	--------------------------------	----------------------------

	Protein concn. (mg/ml)	Phenoloxidase activity (U/ml)*	Specific activity (U/mg protein)
Hemolymph	10	0,04	0,004
Native Hc	14	0,18	0,013
Negative control	0	0	

* 1 Unit = increase of 1 absorbance unit/minute



Figure 2.1 Purification of *C. opilio* Hc by gel-filtation chromatography (Superdex pg 200 column). (A) Elution profiles obtained in native conditions (20 mM Tris-HCl buffer at pH 7.5, 20 mM CaCl₂) (solid line) and after 24h of dissociation at pH 9.2 in the presence of 10 mM EDTA (dashed line). (B) Elution profiles obtained after reassociation of monomers in 20 mM Tris-HCl buffer at pH 7.5 containing 20 mM CaCl₂ after 24h (solid line) and after 48 h (dashed line).



Figure 2.2 SDS-PAGE of hemolymph and various purified fractions obtained from *C. opilio* Hc. Lane 1, SDS-PAGE molecular protein standards with molecular mass (kDa) indicated on the left; lanes 2-3, hemolymph (8 and 5 μ g); lane 4, dodecamer (5 μ g); lane 5, hexamer (5 μ g).



Figure 2.3 Native-PAGE of hemolymph and various purified fractions obtained from *C. opilio* Hc. Lane 1, High molecular weight protein standards; lane 2, native Hc (5 μ g); lane 3, hexamer (5 μ g); lane 4, hemolymph (5 μ g).



Figure 2.4 IEF-PAGE pH 3-7 profiles of hemolymph and purified Hc fractions from *C. opilio.* Lane 1, Serva pI Marker with pH indicated on the right; lane 2, hemolymph (10 μ g); lane 3, native Hc (10 μ g); lane 4, hexamer (10 μ g).

CHAPITRE III

Comparaison des propriétés immunostimulantes de l'hémocyanine de crabe des neiges, *Chionoecetes opilio*, par rapport à d'autres sources disponibles

Comparison of immunostimulating properties of hemocyanin from snow crab, *Chionoecetes opilio*, with other available sources

Résumé

Les propriétés immunostimulantes de préparations d'hémocyanine de crabe des neiges (Chionoecetes opilio) ont été comparées par rapport à d'autres sources disponibles commercialement, dont celle du mollusque marin Megathura crenulata (KLH), du mollusque Concholepas concholepas, (CCH), et de l'arthropode Limulus polyphemus (LPH). Sous l'effet de diverses concentrations de ces préparations, diverses réponses immuno-modulatrices ont été comparées sur la lignée de macrophages de souris RAW 264.7. Les résultats révèlent qu'aucune des préparations ne génère de cytotoxicité. Une stimulation de la prolifération cellulaire est plutôt observée suggérant que les différents produits activent les cellules. La production du facteur nécrosant tumoral alpha (TNF- α) est négligeable pour l'ensemble des préparations. Cependant, à partir d'une concentration de 50 μg/ml d'hémocyanine native de crabe des neiges, une augmentation significative de la production d'oxyde nitrique (NO) est observée. De plus, à des concentrations de 0.5 et 5.0 µg/ml, cette même préparation produit les augmentations les plus élevées de la production d'interleukine-6 (IL-6). Ces résultats suggèrent que l'utilisation de l'hémocyanine purifiée de crabe des neiges pourrait être une alternative intéressante et peu coûteuse à exploiter en vue d'utilisations en immunothérapie.

Mots clés : Hémocyanine; crabe des neiges; macrophages; immunostimulant; propriétés

Abstract

The immunostimulating activity of hemocyanin preparations from snow crab (*Chionoecetes opilio*) was compared with other sources commercially available, such as the marine mollusc *Megathura crenulata* (KLH), the mollusc *Concholepas concholepas* (CCH), and the arthropod *Limulus polyphemus* (LPH). Under the effect of these preparations at different concentrations, varying immuno-modulating responses were compared on the RAW 264.7 murine macrophage cell line. Results reveal that none of the preparations generate cytotoxicity. A comparable stimulation of cell proliferation is rather observed. The production of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is negligible for all preparations. However, from a concentration of 50 µg/ml of native hemocyanin from snow crab, a significant increase of nitrous oxide (NO) production is observed. Moreover, at concentrations of 0.5 and 5.0 µg/ml, this preparation produces the highest increases of the production of interleukin-6 (IL-6). Those results suggest that purified hemocyanin from snow crab would be an interesting and affordable alternative to use in view of immunotherapeutic uses.

Keywords: Hemocyanin; snow crab; macrophages; immunostimulating; properties

3.1 Introduction

Hemocyanins (Hcs) are respiratory copper-containing proteins found in the hemolymph of various molluscs and arthropods (van Holde and Miller, 1995; Markl, 1986; Sanchez et al., 1998). Molluscan Hcs exist as cylindrical structures that are built up of 10 (cephalopods) or 20 (gastropods) 350-450 kDa subunits. These subunits are composed of seven or eight globular functional units, having a molecular mass of about 50 kDa, and carrying a pair of copper atoms enabling the reversible binding of molecular oxygen (Préaux and Gielens, 1984; Siddiqui et al., 2007). Arthropodian Hcs are multimeric proteins in which each subunit has a molecular mass of about 75 kDa, each containing one binuclear copper oxygen-binding site, which represents the functional and structural subunit (van Holde and Miller, 1995). Subunits are arranged as hexamers which may be eventually associated into oligohexamers (Markl and Decker, 1992). Within crustaceans, dodecameric (2 x 6) and hexameric (1 x 6) Hcs are generally found (Markl, 1986).

The most documented hemocyanin (Hc) is from the marine gastropod *Megathura crenulata*, commonly known as Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), which has shown excellent immuno-therapeutic properties against various types of cancer (breast, prostate, pancreas, bladder) (Lamm et al., 2000; McFadden et al., 2003; Riggs et al., 2002; Olsson et al., 1974; Tzianabos, 2000). Its high efficiency and safety actually represents great promise for the treatment of superficial bladder carcinoma (Lamm et al., 2003). Its action mechanism was shown as a non-specific immune-stimulating effect on many types of cells from the immune system (T cells, monocytes, macrophages, polymorphonuclear lymphocytes) in both animals and man, resulting in a death of tumor cells (Tzianabos, 2000; Riggs et al., 2004).

KLH is also known for its great capacity to stimulate antibody production (immunogenic properties) (Burke et al., 1977; Moroz et al., 1973). The clinical use of KLH as a carrier protein for antibody production was found in various promising applications (anti-tumor vaccines, adjuvant treatment in antimicrobial therapies, auto-immune treatments, reproductive hormonal controls, antibodies for immuno-detection and immuno-affinity

purification) (Curtis et al., 1970, 1972; Herscowitz et al., 1972; Swanson and Schwartz, 1967; Lamm et al., 2000; Gebauer et al., 1994; Becker et al., 1998; Harris and Markl, 1999).

Those versatile applications of KLH have led to a growing scientific interest in the structure, function and diversity of new sources of Hcs, as well as their immunogenic and immunotherapeutic properties (Markl et al., 2001; Jurincic-Winkler et al., 2000; Musselli et al., 2000; Harris and Markl, 1999; van Holde and Miller, 1995). As a consequence, an increasing number of sources of Hcs became commercially available, such as the Chilean gastropod Concholepas concholepas (CCH), the horseshoe crab (Limulus polyphemus) (LPH), and the abalone (Haliotis tuberculata) (HTH). CCH has shown significant immunostimulatory effect, as well as antitumor activity against murine bladder carcinoma cells (De Ioannes et al., 2004, Moltedo et al., 2006, Oliva et al., 2002). HTH is considered to be a possible substitute for KLH as an immunostimulating agent (Markl et al., 2001). LPH is mainly known for its immunogenic properties (Amkraut et al., 1969; Chu et al., 1983; Xu et al., 2006). However, most of these sources of Hc are actually limited or overexploited. To assure the continuous supply of KLH, this is mainly produced from aquaculture of the mollusc M. crenulata, culture which allows the harvest of the hemolymph without scarifying animals. Consequently, those commercial preparations are very expensive. This justifies orientations towards new abundant and renewable sources of hemocyanin. Among these, the snow crab (Chionoecetes opilio) is actually looked after.

Snow crab is an abundant crustacean abundantly found in the northwest Atlantic where fishery processing industry generates a large quantity of byproducts which are actually under-exploited (Vilasoa-Martínez et al., 2006; Hébert et al., 1992). Hc found in its hemolymph was shown to be a mixture of hexamers and dodecamers, which were made up of a 73 kDa subunit (see chapter II). A leading question has to be asked as to whether or not the snow crab Hc might act equally well as an immunotherapeutic agent as KLH, CCH, and HCH, which are the main sources of Hcs available commercially. Therefore, the aim of the present work was to compare the non-specific immunostimulatory responses of Hc from snow crab with various commercially available Hcs in the presence of murine macrophage cell line RAW 264.7 activated with lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ).

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Hemocyanin preparations

Commercial purified Hc preparations were from *Megathura crenulata* (keyhole limpet), (KLH) (Calbiochem, 374825), *Concholepas concholepas* (CCH) (Sigma-Aldrich, B8556), and *Limulus polyphemus* (LPH) (Sigma-Aldrich, H1757).

Hc preparations from *Chionoecetes opilio* (COH) included the hemolymph (COHhemolymph) and two purified Hc fractions, such as the native Hc (COH-native), and the hexamer component (COH-hexamer). The COH-hemolymph preparation was obtained from centrifugation at 10,000 x g for 20 min., followed by microfiltration at 0.45 μ m, and dilution in phosphate buffer saline buffer (PBS) : 0.15M NaCl + 20 mM phosphate at pH 7.4 to obtain a protein concentration of 9.85 mg/ml. The purified Hc fractions from *Chionoecetes opilio* were obtained using size-exclusion chromatography (superdex 200 column, GE Healthcare) where the mixture of both peaks (dodecamer + hexamer) collected together constituted the COH-native fraction, and the second peak collected from the top to the end constituted the COH-hexamer fraction, based on earlier study (see Chapter II). The COH-native and COH-hexamer preparations were obtained after diafiltration in PBS to obtain final protein concentrations of 14.43 mg/ml and 8.06 mg/ml, respectively.

3.2.2 Protein determinations

BCA Protein Assay kit (Pierce) with Bovine Serum Albumin (BSA) as standard was used to determine the protein concentration according to the supplier's instructions.

3.2.3 Cell culture

Murine macrophage cell line (RAW 264.7) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 10% fetal bovine serum (VWR, Hyclone), 100 U/mL of penicillin, 100 μ g/mL of streptomycin (Invitrogen), and 2
mM of glutamine (Invitrogen). Cells were grown at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂. Unless stated otherwise, DMEM was amended with 0.4μ g/ml LPS (Sigma) and 0.8 ng/ml IFN γ (Sigma) to promote the Inductible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and nitrous oxide (NO) production.

3.2.4 Effect of Hc preparations on cell growth and metabolism stimulation

The cytotoxicity of Hc preparations was evaluated using the alamarBlueTM test, where the stimulation of cell viability (growth and metabolic activity) was based on the rate of incorporation of the fluorometric/colorimetric indicator. For the test, RAW 264.7 cells $(1x10^5 \text{ cells/well in 96-well culture plates})$ were incubated at 37°C (5% CO₂) in the presence of each Hc preparation at concentrations of 0 [control], 12.5, 25, 50, 100 and 200µg/ml, with 10% of alamarBlueTM (Biosources). After an incubation period of 48 h, the 96-well culture plate was centrifuged at 1200 rpm and 100µl of each supernatant were transferred into black microtiter plates to measure the fluorescence (Em_{535nm}/Ex_{590nm}) using an automated plate reader (Tecan Genios). Each treatment was performed twice. Results were expressed as the stimulating index, corresponding to the response ratios vs. control without Hc.

3.2.5 Effect of Hc preparations on nitrous oxide (NO) production

NO is a mediator of many physiological processes implicated in immuno-modulating reactions, including vasodilatation, inflammation, and also neurotransmission. Nitrite concentrations were measured as an indicator of NO production, using the Greiss reaction (Green et al., 1982) which measured the presence of nitrites generated after spontaneous NO degradation. This method could allow nitrite detection as low as 1 μ M. For the test, RAW 264.7 cells (1x10⁵ cells/well in 96-well culture plates) were incubated at 37°C (5% CO₂) with LPS (0.4 μ g/ml), IFN γ (0.8 ng/ml), and each Hc preparation at concentrations of 0[control], 2, 10, 50 and 100 μ g/ml during 48h, to compare nitrous oxide (NO) production. After the incubation period, 150 μ l of each supernatant were mixed with 150 μ l of Greiss reagent at room temperature for 30 min. The nitrite determinations at 548 nm were compared using a standard curve of NaNO₂. Each treatment was performed in duplicate.

3.2.6 Effect of Hc preparations on cytokine production

Pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α are among the first cytokines produced by phagocytic cells in response to encounters with pathogenic agents (Morita et al., 2002) and immunostimulating agents (Barsig et al., 1995). For the test, RAW 264.7 cells ($1x10^5$ cells/well in 96-well culture plates) were incubated at 37°C (5% CO₂) and Hc preparations at concentrations of 0[control], 0.005, 0.05, 0.5, 5 and 50 µg/ml during 48h. Cell culture supernatants were collected for the determination of interleukin (IL)-6 and Tumor Necrosis Factor α (TNF-α). The cytokine production was measured and compared using a specific sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) development system kit (R&D Systems), according to the manufacturer's protocols. Each treatment was performed in triplicate.

3.2.7 Statistical analysis

Values in the figures were expressed as means \pm SD (error bars). For each experiment, analysis of variance (ANOVA) and the least significant difference test (LSD) at p=0.05 were done for comparison of the effect of each treatment (Hc preparations and control). Treatments producing significantly higher values at p=0.05 were indicated by an (*).

3.3 Results

3.3.1 Effect of Hc preparations on the stimulation of cell growth and metabolism

The effect of various Hc preparations on RAW 264.7 cell viability stimulation is shown in Fig. 1, where none of the preparations from 12.5 to 200 μ g/ml exhibited a cytotoxic effect on the macrophage cell line (no negative stimulatory index), compared to untreated cells (control). At 12.5 μ g/ml Hc, various responses of viability were observed with most of the preparations. The lower responses obtained from CCH and COH hexamer were not significantly different to the control, but significantly lower than LPH, showing the maximal response.

At higher concentrations, the responses levelled up and remained mainly comparable between the various preparations. These results clearly revealed a stimulation of RAW 264.7 cell growth and viability from Hc preparation concentrations $\geq 12.5 \ \mu g/ml$.

3.3.2 Effect of Hc preparations on nitrous oxide (NO) production

The effect of various Hc preparations on NO production with RAW 264.7 cells is shown in Fig. 2. For the majority of preparations, no significant increase of the response was observed in comparis on with the control, and tendencies towards slight dose-dependent decreases of the responses followed by increases at 100 mg/ml were observed. However, the COH-native preparation showed a broad tendency towards higher responses than any other Hc preparation. At 50-100 μ g/ml, its response was significantly higher than the control's reponse, and its maximal response at 50 μ g/ml was significantly higher than any other preparation. This clearly revealed that COH–native was the most efficient preparation to stimulate the NO production. Among the COH preparations, the native fraction mainly showed the highest responses, followed by the hexamer and hemolymph, which were both comparable.

3.3.3 Effect of Hc preparations on cytokine production

The effect of various Hc preparations on production of cytokines (TNF- α and IL-6) by RAW 264.7 cells is presented in Fig. 3. The TNF- α production (Fig. 3A) remained comparable whatever the preparation, including the control. The IL-6 production (Fig. 3B) mainly showed a dose-dependent increase of the responses with most of the preparations, with few exceptions. At the various concentrations tested, the COH-native showed a broad tendency towards higher responses than any other type of preparation or the control, especially at 0.5 and 5.0 µg/ml where responses were significantly higher. This clearly revealed that COH-native was the most efficient Hc preparation to stimulate the IL-6 production. Among the COH preparations, the native fraction mainly showed the highest responses, followed by the hexamer, and the hemolymph.

3.4 Discussion

In this study, various commercial preparations of Hc (KLH, CCH and LPH) were compared with *C. opilio* hemolymph, hexameric and native Hc for their immunostimulating activity. KLH has been used extensively in immunology as carrier proteins to produce antibodies against haptens. To induce an immune response, antigens are taken by antigen-presenting cells (APC) and processed before their presentation to T-lymphocytes. The immunogenicity of a molecule depends on its nature, molecular mass, and complexity. Successful production of antibodies specific to small antigens (i.e., peptides or drug compounds) requires that these haptens be covalently conjugated to a larger, more complex molecule (usually a protein) to make them immunogenic. KLH is a large molecule, and it forms aggregates which facilitate its uptake by antigen presenting cells such as dendritic cells.

This molecule is also used in cancer therapy (Lamm et al., 2000; Linn et al., 2000; McFadden et al., 2007). The modes of action of KLH on cancer cells are not known. This molecule could act as carrier for antigen presentation and facilitate activation of weak peptide-reactive cytotoxic T lymphocytes (Millard et al., 2003).

Some results indicate that KLH promotes directly the maturation of dendritic cells and this could explain the efficacy of KLH when co-administrated with other antigens in immunotherapeutic protocols (Presicce et al., 2008). KLH also showed direct effects on cancer cells by reducing cellular proliferation via early apoptotic pathways (Somasundar et al., 2005; Riggs et al. 2005).

The multiple uses of KLH in basic and clinical research in cancer therapy, vaccine development, and diagnosis for example, suggest that the high demand for KLH will increase the search for alternative molecules. The versatile properties of KLH have derived in a growing interest on the knowledge of Hc structure, and encouraged to seek other alternatives of Hcs with equivalent immunological and therapeutic properties. In the same context, Hc from *Concholepas concholepas* may be a potential alternative to KLH, based on its successful use as a carrier (Oliva et al., 2002). The candidate *C. opilio* Hc must have

many advantages such as abundance, easy obtention and purification, together with comparable or stronger immunostimulatory potential.

Since Hc could exert anti-proliferative effects on myeloma cells, we first evaluated the effect of different Hc preparations on cell viability. Instead to reducing cell viability, the different Hcs increased cell metabolism and/or proliferation of the monocytic cell line RAW 264.7. These results suggested that the different Hc preparations including Hc from *C.opilio* could exert a direct effect on the cell line.

We also demonstrated that native Hc from *C.opilio* is the only preparation that has a significant effect on the production of pro-inflammatory mediators (NO and IL-6) by activated cells. It could be hypothesized that the effects of native Hc are mediated by its interaction with receptors on RAW 264.7. In fact, Presicce et al. (2008) have recently demonstrated that the stimulatory activity of KLH is indeed partially mediated through interactions with mannose receptors.

3.5 Conclusions

The present study suggests that this source of Hc would be a potent alternative for immunotherapeutic applications. Interfering substances present in COH-hemolymph and the absence of the dodecamer in COH-hexamer could explain their lower immunomodulating responses compared to native COH (dodecamer + hexamer).

Acknowledgements

The financial support from Innovation and Technologies Directorate (DIT-MAPAQ) and the Gaspésie-Les Iles Community Foundation (FCGI) are gratefully acknlowledged.



Figure 3.1 Effect of various types of Hc on RAW 264.7 cell stimulating index following exposure to different concentrations of Hc. The cell stimulating index corresponds to the response ratio vs. control without Hc, using the alamarBlueTM test. Cells were exposed to 12.5 (), 25 (), 50 (), 100 () and 200 () μ g/ml. Each value represents the mean ± S.D. of duplicate determinations.







Figure 3.3 Cytokine production TNF- α (A) and IL-6 (B) by RAW 264.7 cells after exposure to different types of Hc: 0 (control, \Box), 0.005 (\blacksquare), 0.05 (\blacksquare), 0.5 (\blacksquare), 5 (\blacksquare) and 50 (\boxtimes) µg/ml. Each value represents the mean ± S.D. of triplicate determinations. The concentration of cytokine in supernatant was analyzed with commercial cytokine ELISA kits.

66

CONCLUSION GÉNÉRALE

La biodiversité des espèces marines est grande et leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques permettent d'y déceler des biomolécules d'un grand intérêt en vue de divers secteurs d'applications (pharmaceutique, nutraceutique, cosmétiques et autres). Chez les arthropodes, et en particulier le crabe des neiges (*Chionoecetes opilio*), l'hémolymphe (liquide physiologique) renferme l'hémocyanine, une protéine d'un grand intérêt en vue d'applications thérapeutiques.

La première partie de cette étude avait donc pour objectif de purifier et caractériser l'Hc provenant de l'hémolymphe du crabe des neiges. Les résultats obtenus ont démontré que la protéine native est constituée de deux états d'association dont le dodécamère (31%) et l'hexamère (69%). Une réversibilité complète des ses états d'association a aussi été observée. Les analyses d'électrophorèse SDS-PAGE et IEF ont révélé une hétérogénéité des sous-unités protéiques. De plus, il a été démontré que l'Hc a une activité phénoloxydase en présence de L-DOPA, mais que la présence d'unités glucidiques est non détectable avec le test à l'acide périodique-base de Schiff.

La deuxième partie des travaux a permis de comparer les propriétés immunostimulantes de l'Hc de crabe des neiges (hémolymphe et certaines fractions purifiées) par rapport à des préparations d'Hc commerciales. Les résultats ont révélé que toutes les préparations stimulent de façon comparable la prolifération et le métabolisme des macrophages de souris RAW 264.7. La production de monoxyde d'azote (NO) fut significativement plus élevée à partir d'une concentration de 50 μ g/ml d'Hc native de crabe des neiges (COH-native). De plus, la production d'interleukine (IL-6) fut significativement plus élevée avec la préparation de COH-native à des concentrations de 0.5 et 5.0 μ g/ml.

Les résultats de cette étude apportent donc une évidence quant au potentiel immunostimulant de l'Hc purifiée du crabe des neiges, qui est comparable ou supérieur à celui de préparations commerciales actuellement disponibles. Ces résultats ainsi que la grande disponibilité de la ressource suggèrent que l'utilisation cette biomolécule pourrait

être une alternative intéressante et peu coûteuse à exploiter en vue d'une utilisation immuno-thérapeutique. Néanmoins, des tests immunologiques plus spécifiques sur l'effet de l'Hc de crabe des neiges ainsi que sa réponse sur des lignées de cellules cancéreuses seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse. De plus, d'autres études devront être réalisées afin d'évaluer le potentiel d'applications biotechnologiques de l'Hc du crabe des neiges. Par exemple, le couplage d'Hc à des haptènes pour le développement de vaccins ou agents immuno-thérapeutiques contre certains types de tumeurs cancéreuses, ou encore l'évaluation du potentiel antimicrobien de l'Hc et ses hydrolysats.

BIBLIOGRAPHIE

Achike, F.I., Kwan, C.Y. (2003). Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signaling pathway. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 30, 605-615.

Adachi, K., Hirata, T., Nagai, K., Sakaguchi, M. (2001). Hemocyanin: a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage. *J. Food. Sci.*, 66, 1130–1136.

Adachi, K., Hirata, T., Nishioka, T., Sakaguchi, M. (2003). Hemocyte omponents in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *J. Comp. biochem. Physiol. B*, 134, 135-141.

Adachi, K., Endo, H., Watanabe, T., Nishioka, T., Hirata, T. (2005). Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization. *Pigment Cell Res.*, 18, 136-143.

Ahmer, B.M.M., Durbin, J., Caligiuri, M.A. (2006). STAT-1-mediated repression of monocyte interlukin-10 gène expression in vivo. *Eur. J. Immunology*, 36, 623-630.

Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its régulation. *Life Sci. and Genetics*, 19, 302-309.

Alfred A. Amkraut, Arthur Malley and Donald Begley (1969). Immunogenicity of Hemocyanins and their Subunits. J. Immunology, 103, 1301-1310.

Andersen, M. (1993). Inshore survey for snow crab, *Chionoecetes opilio*, in West Greenland. *International Council for Exploration of the Sea (ICES)*, 47, 1-9.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis), 15th Edn. AOAC, Washington D.C. (USA) (1995). Official method 984.20 moisture in oils and fats, chap. 41, p.1.

Bailey, R. F. J., Elner, R.W. (1989). Northwest Atlantic snow crab fisheries: lessons in research and management. Dans *Marine invertebrate fisheries: their assessment and management*. J. F. Caddy (ed.). John Wiley and Sons, New York, 261-280.

Barsig, J., Kusters, S., Vogt, K., Volk, H. D., Tiegs, G., Wendel, A. (1995). Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 mice: role of endogenous tumor necrosis factoralpha. *Eur. J. Immunol.*, 25, 2888-2893.

Becker, M.I. (2004). Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *J. Biol. Chem.*, 279 (25), 26134-26142.

Beintema, J.J, Stam, W.T, Hazes, B., Smidt, M.P. (1994). Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). *Mol. Biol. Evol.*, 11, 493-503.

Beltramini, M., Colangelo, N., Giomi, F., Bubacco, L., Di Muro, P., Hellmann, N., Jeanicke, E., Decker, H. (2005). Quaternary structure and functional properties of *Penaeus monodon* hemocyanin. *FEBS J.*, 272, 2060-2075.

Bissonnette, E.Y., Proulx, L.I., Turmel, V., Drouin, R., Purcell, M. (2004). PCT-233, a novel modulator of pro- and anti-inflammatory cytokine production. *Clin. Exp. Immunol.*, 135, 440-447.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.

Boyer, R.F. (1986) *Modern experimental biochemistry*, Addison-Wesley Publishing Co., Reading (Mass., USA), 248-250.

Bridges, C.R. (2001). Modulation of hemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world. J. Exp. Biol., 204, 1021–1032.

Brun, G.L., Wojtowicz, M.B. (1976). A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of Jonah crab (*Cancer borealis*) and rock crab (*Cancer irroratus*). J. Comp. Biochem. Physiol. B, 53, 387-391.

Burger, J., Dixon, C., Shukla, T., Tsipoura, N. Gochfeld, M. (2002). Metal levels in horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*) from Maine to Florida, *Envion. Research.*, 90, 227-236.

Burke, G.P., Smith, K.A., Stocking, R.I.G., Ferm, M., McIntyre, R.O. (1977). Anti-Keyhole limpet hemocyanin antibody in normal unsensitized individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 59, 309-313.

Burmester, T. (2001). Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Mol.Biol.Evol.*, 18, 184-195.

Burmester, T., Scheller, K. (1996). Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin and dipteran arylphorin receptor. J. Mol. Evol., 42, 713–728.

Burmester, T., Heyd, J., Wriggers, W. and Markl, J. (2007). *Limulus polyphemus* hemocyanin: 10 A cryo-EM structure, sequence analysis, molecular modeling and rigid-body fitting reveal the interfaces between the eight hexamers. *J. Mol. Biol.*, 366, 1332-1350.

Burnett, L.E. (1992). Integrated function of the respiratory pigment hemocyanin in crabs. *Am. Zool.*, 32, 438-446.

Bushing, B. (2004). 084: Giant Keyhole Limpet. Educational Multimedia. http://www.starthrower.org/products/DDDB/DDDB_050099/DDDB_084%20giant%20key hole%20limpet.htm

Carroll, N.V., Longley, R.W., Roe, J.H. (1956). The determination of glycogen in liver and muscle by use the anthrone reagent. J. Biol. Chem., 222, 583-593.

CQVB (Centre Québécois de Valorisation des Biotechnologies) (2005). Les coproduits marins issus des usines de transformations des régions maritimes du Québec : évaluation des volumes de résidus - identification et caractérisation des bio-molécules d'intérêt pharmaceutique, cosméceutique et nutraceutique.

Chatenoud, L, (2002). Cellules de l'immunité. Dans: *Immunologie, de la biologie à la clinique*. J. F. Bach et L. Chatenoud. (ed), Paris, France: Flammarion Médicine-Sciences, p. 369.

Chausson, F., Bridges, C.R., Sarradin, P., Green, B.N., Riso, R., Caprais, J., Lallier, F.H. (2001). Structural and functional properties of hemocyanin from Cyanagraea praedator, a deep-sea hydrothermal vent crab. *Proteins*, 45, 351-359.

Chu, C., Schneerson, R., Robbins, J.B., Rastogi, S.C., (1983). Further Studies on the Immunogenicity of Haemophilus influenzae Type b and Pneumococcal Type 6A Polysaccharide-Protein Conjugates. *Infect Immun.*, 40(1), 245–256.

Coleman, J.W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1397-1406.

Comeau, M., Conan, G. Y. (1992). Morphometry and gonad maturity of male snow crab, *Chionoecetes opilio. Can, J. of Fisheries and Aquat. Sci.*, 49, 2460-2468.

Comeau, M., Conan, G. Y., Robichaud, G., Jones, A. (1991). Life history patterns and population fluctuations of snow crab (*Chionoecetes opilio*) in the fjord of Bonne Bay on the west coast of Newfoundland, Canada — from 1983 to 1990. *Can. Technical Report of Fisheries and Aquat. Sci.*, 1817, 82.

Conan, G. Y., Comeau, M. (1986). Functional maturity and terminal molt of male snow crab, *Chionoecetes opilio. Can. J. of Fisheries and Aquatic Sci.*, 43, 1710-1719.

Cuff, M.E., Miller, K. I., van Holde, K. E., Hendrickson, W. A. (1998). Crystal structure of a functional unit from *Octopus dofleini* hemocyanin. J. Mol. Biol., 278, 855-870.

Dainese, E., Di Muro, P., Beltramini, M., Salvato, B., Decker, E. (1998). Subunits composition and allosteric control in *Carcinus aestuarii* hemocyanin. *Eur. J. Biochem.*, 256, 350–358.

Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H., Jones, K.M. (1986). Data for biochemical research, Clarendon Press, Oxford Science Publications, 537-538.

De Ioannes, P., Molteno, B., Oliva, H., Pacheco, R., Faunes, F., De Ioannes, A.E., Becker, M.I. (2004). Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *J. Biol. Chem.*, 279 (25), 26134-26142.

Decker, H., Jaenicke, E. (2004). Recent findings on the phenoloxidase activity and antibacterial activity of hemocyanins. *Dev. Comp. Immunol.*, 28, 673-687.

Decker, H., Rimke, T. (1998). Tranulata hemocyanin shows phenoloxidase activity. J. Biol. Chem., 273, 25889–25892.

Decker, H., Ryan, M., Jaenicke, E., Terwilliger, N. (2001). SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. J. Biol. Chem., 276, 17796-17799.

Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., Bachère, E. (1997). Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.*, 272, 28398-28406.

Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.-M., Bachère, E. (1999). Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem.*, 266, 335-346.

Destoumieux, D., Munoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., Bachère, E. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced andstored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.*, 113, 461-469.

Destoumieux-Garzon, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., Bachère, E. (2001). Crustacean Immunity: Antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.*, 276, 47070-47077.

Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Rebuffat, S. (2002). Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie*, 84, 511-519.

Dolashka-Angelova, P., Dolashki, A., Savvides, S., Hristova, R., Van Beeumen, J., Voelter, W., Devreese, B., Weser, U., Di Muro, P., Salvato, B., Stevanovic, S. (2005). Structure of hemocyanin subunit CaeSS2 of the crustacean Mediterranean crab *Carcinus aestuarii*. J. Biochem., 138, 303-312.

Dufour, R., Sainte-Marie, B. (2001). Crabe des neiges de l'estuaire et du nord du golfe du Saint-Laurent (zones 13 à 17). MPO, Sciences, Rapport sur l'état des stocks, C4-01, p. 16.

Ellerton, H.D., Ellerton, N.F., Robinson, H.A. (1983). Hemocyanin: a current perspective. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 41, 143-248.

Fabricius, J.C. (1787). Mantissa Insectorum sistens eorum Species nuper detectas adiectis Characteribus Genericis, Differentiis Specificis, Emendationibus, Observationibus, Proft, Hafniae, 1, 1-348.

Fariselli, P., Bottoni, A., Bernardi, F., Casadio, R. (1999). Quantum mechanical analysis of oxygenated and deoxygenated states of hemocyanin: theoretical clues for a plausible allosteric model of oxygen binding. *Protein Science*, 8, 1546-1550.

Figueroa-Soto, C.G., Calderòn de la Barca, A.M. (1997). Purification of hemocyanin from white shrimp (*Panaeous vannamei boone*) by immobilized metal affinity chromatography. J. Comp. Biochem. Physiol. B, 117, 203-208.

Fredericq, L. (1878). Sur l'hemocyanine, substance nouvelle du sang de Poulpe (Octopus vulgaris), Comptes-Rendus Acad. Sci., 87, 996-998.

Gaykema, W.P.J., Groendijk, H., Doorten, G., Vereyken, J.M., Hol, W.G.J., Brenner, S (1983). Crystals containing a single subunit type of *Panulirus interruptus* haemocyanin. J. *Mol.Biol.*, 168,197-201.

Genetet, N. (1997). Immunologie. Éditions Médicales Internationales, Paris, France, p. 604.

Ghiretti-Magaldi, A., Ghiretti, F. (1992). The prehistory of hemocyanin. The discovery of copper in blood of molluscs. *Experientia*, 48, 971-972.

Giomi, F., Beltramini, M. (2007). The molecular heterogeneity of hemocyanin : Its role in the adaptive plasticity of Crustacea. *Gene.*, 398, 192-201.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analyt. Biochem.*, 126, 131-138.

Harris, J.R., Markl, J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review, *Micron*, 30, 597-623.

Harris, J.R., Markl, J. (2000). Keyhole limpet hemocyanin: molecular structure of a potent marine immunoactivator. A review. *Eur. Urol.*, 37, 3, 24-33.

Hazes, B., Magnus, K.A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K.H., Hol, W.G.J. (1993). Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 A resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Prot. Science*, 2, 597-619.

Herskovits, T.T. (1988). Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins. J. Comp. Biochem. Physiol. B, 91, 597-611.

Holmes, M., Trong, I., Turley, S., Sieker, L., Stenkamp, R. (1991). Structures of deoxy and oxy hemerythrin at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 218, 583-593.

Hughes, A.L. (1999). Evolution of the arthropod prophenoloxidase/hexamerin protein family. *Immunogenetics*, 49, 106–114.

Jeffrey, P.D., Shaw, D.C., Treacy, G.B. (1976). Hemocyanin from the Australian crayfish Cherax destructor: studies of two different monomers and their participation in the formation of multiple hexamers. *Biochemistry*, 15, 5527–5533.

Jurincic-Winkler, C.D., Metz, K. A., Beuth, J. et Klippel, K. F. (2000). Keyhole Limpet Hemocyanin for Carcinoma in situ of the Bladder: A Long-Term Follow-Up Study. *Eur. Urol.*, 37, 45-49.

Kapoor, M., Shaw, O., Appleton, L. (2005). Possible anti-inflammatory rôle of COX-2derived prostaglandins: implications for inflammation research. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 6, 461-466.

Karlin, K.D., Cruse, R.W., Gultneh, Y., Farooq, A., Hayes, J.C., Zubieta, J. (1987). Dioxygen-copper reactivity. Reversible binding of O_2 and CO to a phenoxo-bridged dicopper(I) complex. J. Am. Chem. Soc., 109, 2668-2679.

Kawabata, S., Nagayama, R., Hirata, M., Shigenaga, T., Agarwala, K., Saito, T., Cho, J., Nakajima, H., Takagi, T., Iwanaga S. (1996). Tachycitin, a small granular component in horseshoe crab hemocytes, is a antimicrobial protein with chitin-binding activity. *J Biochem.*, 120, 1253–1260.

Kawano, K., Yoneya, T., Miyata, T., Yoshikawa, K., Tokunaga, F., Terada, Y., Iwanaga, S. (1990). Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocyates of the horseshoe crab (Tachypleus tridentatus). NMR determination of the beta-sheet structure. *J. Biol. Chem.*, 265, 15365–15367.

Kidd, P., (2003). Th_1/Th_2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.*, 8, 223-246.

Klimova, O.A., Chebotarev, V.Yu. (2000). Collagenolytic protease preparations from invertebrates: biochemical aspects of medical and cosmetological applications. *Bull. Exper. Biol. Med.*, 130, 671-675.

Kopacek, P., Weise, C., Gotz, P. (1995). The Prophenoloxidase from the Wax Moth *Galleria mellonella*: Purification and Characterization of the Proenzyme. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25, 1081-1091.

Krôncke, K-D., Suschek, C.V., Kolb-Bachofen, V. (2000). Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antioxid. Redox Signal.*, 2, 585-605.

Kuiper, H.A., Gaastra, W., Beintema, J.J., van Bruggen, E.F.J., Schepman, A.M.H., Drenth, J. (1975). Subunit composition, X-ray diffraction, amino acid analysis and oxygen binding behaviour of *Panulirus interruptus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.*, 99, 619-629.

Kurokawa, T., Wuhrer, M., Lochnit, G., Geyer, H., Markl, J., Geyer, R., (2002). Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal(beta1-6)Man-motifs. *Eur. J. Biochem.*, 269, 5459-5473.

Kusche, K., Ruhberg, H., Burmester, T.A. (2002). Hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 10545-10548.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature, 227, 680-685.

Lamm, D.L., DeHaven, J.I., Riggs, D.R. (2000). Keyhole limpet hemocyanin for carcinoma in situ of the bladder cancer: Laboratory and clinical studies. *Eur. Urol.*, 37, 41-44.

Lamm, D.L., DeHaven, J.I., Riggs, D.R., Ebert, R.F. (1993). Immunotherapy of murine bladder cancer with keyhole limpet hemocyanin (KLH). J. Urol., 149, 648-652.

Lee, S. Y., Lee, B. L., Soderhall, K. (2004). Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 322, 490–496.

Lee, S., Lee, B., Söderhäll, K. (2003). Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Biol. Chem., 278(10), 7927-7933.

Lee, S.H., Lee, S.Y., Son, D.J., Lee, H., Yoo, H.S., Song, S., Oh, K.W., Han, D.C., Kwon, B.M., Hong, J.T., (2005). Inhibitory effect of 2'hydroxycinnamaldehyde on nitric oxide production through inhibition of NF-KB activation in RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 69, 791-799.

Li, H., Poulos, T.L. (2005). Structure-function studies on nitric oxide synthases. J. Inorg. Biochem., 99, 293-305.

Linzen, B., Soeter, N. M., Riggs, A.F., Schneider, H.J., Schartau, W., Moore, M.D., Yokota, E., Behrens, P.Q., Nakashima, H., Takagi, T. and al. (1985). The structure of arthropod hemocyanins. *Science*, 229 (5), 19–524.

Lommerse, J.P.M., Thomas-Oates, J.E., Gielens, C., Preaux, G., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G. (1997). Primary structure of 21 novel monoantennary and diantennary N-linked carbohydrate chains from alpha D-hemocyanin of Helix pomatia. *Eur. J. Biochem.*, 249, 195-222.

MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 323-350.

Maddaluno, J., Faull, K.F. (1999). Mass spectrometric characterization of limulus polyphemus hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 264, 883-890.

Magnus, K.A., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Hol, W.G.J. (1994). Crystallographic Analysis of Oxygenated R Deoxygenated States of Arthropod Hemocyanin Shows Unusual Differences. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 19, 302-309.

Makino, N. (1985). An oxygenation-linked dye binding to Limulus polyphemus hemocyanin. Eur. J. Biochem., 146, 563-569.

Mangum (Ed.), Advances in Comparative and Environmental Physiology. Springer Verlag, Berlin, p.325–376.

Manu-Tawiah W., Haard N. F. (1987). Recovery of carotenoprotein from the exoskeleton of snow crab *Chionoecetes opilio. Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 20, 31–33

MAPAQ (2004) Bilan des réalisations 2002-2004. Valorisation et exploitation, p.75-82.

Markl, J. (1986). Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods, *Biol. Bull.*, 171, 90–115

Markl, J., Decker, H., (1992). Molecular structure of the arthropod hemocyanins. In C.P. Mangum (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology. Springer Verlag, Berlin*, p.325–376.

Markl, J., Schmid, R., Czichos-Tiedt, S., Linzen, B. (1976). Haemocyanins in spiders, III. Chemical and physical properties of the proteins in Dugesiella and Cupiennius blood. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, 357, 1713-1725.

Markl, J., Savel, A., Knabe, B., Storz, H., Krabbe, T., Abel, S., Markl, B. (1986). Mercury ions - a tool to study the specific role of individual subunits in the allosteric interaction of arthropod hemocyanins. In: *Invertebrate oxygen carriers* (Linzen B, ed). Springer, Heidelberg, p.403-406.

Markl, J., Lieb, B., Gebauer, W., Altenhein, B., Meissner, U., Harris, R. (2001). Marine tumor vaccine carriers : structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 127, R3-R9.

Martin, A.G., Depoix, F., Stohr, M., Meissner, U., Hagner-Holler, S., Hammouti, K., Burmester, T., Heyd, J., Wriggers, W. and Markl, J. (2007). *Limulus polyphemus* hemocyanin: 10 A cryo-EM structure, sequence analysis, molecular modeling and rigid-body fitting reveal the interfaces between the eight hexamers. *J. Mol. Biol.*, 366, 1332-1350.

McFadden, D.W., Riggs, D.R., Jackson, B.J., Vona-Davis, L. (2003). Keyhole limpet hemocyanin, a novel immune stimulant with promising anticancer activity in Barrett's oesophageal andenocarcinoma. *Amer. J. Surgery*, 186, 552-555.

Molon, A., Muro, P., Bubacco, L., Vasilyev, V., Salvato, B., Beltramini, M., Conze, W., Hellmann, N., Decker, H. (2000). Molecular heterogeneity of the hemocyanin isolated from the king crab *Paralithodes camtshaticae*. *Eur. J. Biochem.*, 267, 7046-7057.

Moltedo, B., Faunes, F., Haussmann, D., De Ioannes, P., De Ioannes, A.E., Puente, J., Becker, M.S. (2006). Immunotherapeutic effect of Concholepas hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *J. Urol.*, 176, 2690-2695.

Morita, H., He, F., Fuse, T., Ouwehand, A.C., Hashimoto, H., Hosoda, M., Mizumachi, K., Kurisaki., J. (2002) Cytokine Production by the marine macrophage cell line J774.1 after exposure to lactobacilli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1963-1966.

Moriyasu, M., Conan, G. Y., Mallet, P., Chiasson, Y. J. (1987). Growth at molt, molting season and mating of snow crab (*Chionoecetes opilio*) in relation to functional and morphometric maturity. *ICES*, Copenhagen, Denmark ICES-CM-1987 / K:21, p.14.

Moroz, L.A., Kygier, V., Kotoulas, A.O. (1973). Normal Human IgG with antibody activity for keyhole limpet hemocyanin. *Immunology*, 25, 441-449.

Morris, S. (1990). Organic ions as modulators of respiratory function during stress. *Physiol. Zool.*, 63, 253–287.

Munoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., Bachère, E. (2002). Exdistribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimps. *Eur. J. Biochem.*, 269, 2678-2689.

Munoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Bulet, P., Saulnier, D., Bachère, E. (2004). Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 961-972.

Murray, A.C., Jeffrey, P.D. (1974). Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish Cherax destructor. Subunit heterogeneity. *Biochemistry*, 13, 3667–3671.

Musselli, C., Livingston, P. O., et Rapugathi, G. (2001). Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: The Memorial Sloan Kettering Cancer experience. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127, R20-R26.

Nagai, T., Kawabata, S. (2000). A link between blood coagulation and prophenoloxidase activation in arthropod host defense. J. Biochem. Chem., 275(38), 29264-29267.

Nagai, T., Osaki, T., et Kawabata, S. (2001).Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. J. Biol. Chem., 276, 27166–27170.

Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., Shimonishi, Y. (1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J Biol Chem.*, 263, 16709–16713.

Nakashima, H., Behrens, P.Q., Moor, M.D., Yokota, E., Riggs, A.F. (1985). Structure of Hemocyanin II from the Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus. J. Biol. Chem.*, 23, 10526-10533.

Nellaiappan, K., Sugumaran, M. (1996). On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus. J. Comp. Biochem. Physiol. B*, 113, 163–168.

Nellaiappan, K., Vinayakam, A., (1993). A method for demontrating prophenoloxidase after electrophoresis. *Biotech. Histochem.*, 68, 193–195.

O'Halloran, M. J., O'Dor, R. K. (1988). Molt cycle of male snow crabs, *Chionoecetes opilio*, from observations of external features, setal changes, and feeding behavior. *J. Crustacean Biol.*, 8, 164-176.

Olianas, A., Sanna, M., Messana, I., Castagnola, M., Masia, D., Manconi, B., Cau, A., Giardina, B., Pellegrini, M. (2006). The hemocyanin of the Shamefaced Crab Calappa granulate : Structural-Functional Characterization. *J. Biochem.*, 139, 957-966.

Oliva, H., Moltedo, B., De Ioannes, P., Faunes, F., De Ioannes, A., Becker, M.I. (2002). Monoclonal antibodies to molluskan hemocyanin Concholepas concholepas demonstrate common and specific epitopes among subunits. *Hybridoma and hybridomics*, 21, 365-374.

Orlova, E. V., Dube, P., Harris, J. R., Beckman, E., Zemlin, F., Markl, J., van Heel, M. (1997). Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15 A resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *J. Mol. Biol.*, 271, 417-437.

Paoli, M., Giomi, F., Hellmann, N., Jaenicke, E., Decker, H., Di Muro, P., Beltramini, M. (2007). The molecular heterogeneity of hemocyanin : Structural and functional properties of the 4 x 6-meric protein of *Upogebia pusilla* (Crustacea). *Gene*, 398, 177-182.

Parnell, P.E., Dayton, P.K., Lennert-Cody, C. (2004). The San Diego-La Jolla Ecological Reserve : *Implications for the Design and Management of Marine Reserves*. Research Com. Reports. University of California, San Diego. Final Report R/CZ-177.

Petrova, L.N., Osypov, K.S., Savel'ev, D.D., Shved, G.M., Hjortdal, J., Kingsbury, S., Gallardo, M.H., Carrasco, J.I. (1996). Genetic cohesiveness among populations of *Concholepas concholepas* (Gastropoda, Muricidae) in Southern Chile. *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.*, 197, 237-249.

Pless D., Aguilar M., Falcon A., Lozano-Alvarez E., Heimer de la Cotera E. (2003). Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. *Arch. Biochem. Biophys.*, 409, 402-410.

Préaux, G., Gielens, C. (1984). Hemocyanins, in : R. Lontie (Ed.), Copper Proteins and Copper Enzymes, CRC Press, Boca Raton II, 159-205.

Punin Crespo, M.O., Vilasoa Martinez, M., Lopez Hernandez, J., Lage Yusty, M.A. (2006). High-performance liquid chromatography determination of chitin in the snow crab, *Chionocetes opilio. J. Chromatography A*, 116, 189-192.

Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W., Rhodes, C. P., (1985). Invertebrate immunity: basis concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.*, 97, 183-350.

Revillard, J.-P. (2001). Immunologie. Bruxelles, Belgium: De Boeck Université. 595 p.

Riggs, D., Jackson, B., Vona-Davis, L., McFadden, D. (2002). In vitro anticancer effects of a novel immunostimulant keyhole limpet hemocyanin. J. surgery research, 108, 279-284.

Roch, P., Mitta, G., Florence, H., Noel, T. (2005). Anti-microbial peptides derived from molluscs. *Dev. Comp. Immunol.*, 24, 381-393.

Sacerdote, P., Manfredi, B., Gaspani, L., Panerai, A.E., (2000). The opioid antagonist naloxone induces a shift from Type 2 to Type 1 cytokine pattern in BALB/cJ mice. *Blood*, 95, 2031-2036.

Sainte-Marie, B. (1993). Reproductive cycle and fecundity of primiparous and multiparous female snow crab, *Chionoecetes opilio*, in the Northwest Gulf of St. Lawrence. *Can. J. Fisheries and Aquat. Sci.*, 50, 2147-2156.

Sainte-Marie, B., Hazel, F. (1992). Moulting and mating of snow crabs, *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius), in shallow waters of the northwestern Gulf of St. Lawrence. Can. J. Fisheries and Aquat. Sci., 49, 1282-1293.

Sainte-Marie, B., Raymond, S., Brêthes, J.C. (1995). Growth and maturation of the benthic stages of male snow crab, *Chionoecetes opilio (Brachyura: Majidae). Can. J. Fisheries and Aquat. Sci.*, 52, 903-924.

Sainte-Marie, B., Gilbert, D. (1998). Possible effects of changes in CIL temperature and thickness on population dynamics of snow crab, *Chionoecetes opilio*, in the Gulf of Saint Lawrence. Canadian Stock Assessment Secretariat Research Document 98/38. Fisheries and Oceans Canada, Ottawa.

Sakharov, I.Y., Glyanzev, S.P., Litvin, F.E., Savvina, T.V. (1993). Potent debriding ability of collagenolytic protease isolated from the hepatopancreas of the king crab Paralithodes camtschatica. *Arch. Dermatol. Res.*, 285, 32-35.

Salvato, B., Beltramini, M. (1990). Hemocyanin: molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper active site, *Life Chem. Rep.*, 8, 1-47.

Salvato, B., Santamaria, M., Beltramini, M., Alzuet, G., Casella, L. (1998). The enzymatic properties of Octopus vulgaris hemocyanin: o-diphenol oxidase. *Biochemistry*, 37, 14065-14077.

Sanchez, D., Ganfornina, M.D., Gutierrez, G., Bastani, M.J. (1998). Molecular characterization and phylogenetic relationship of a protein with potential oxygen-binding capabilities in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects ? *Mol. Biol. Evol.*, 15, 415-426.

Shen, T., Virgil, N., Zou, M., Green, B., Tam, M., Ho, C., (1993). Production of unmodified human adult hemoglobin in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci., 90, 8108-8112.

Siddiqui, N.I., Idakieva, K., Demarsin, B., Doumanova, L., Compernolle, F., Gielens, C. (2007). Involvement of glycan chains in the antigenicity of *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 361, 705-711.

Slizkin, A. G. (1982). Distribution of snow crabs of the genus *Chionoecetes* and their habitat in the northern part of the Pacific Ocean. Dans Population dynamics and reproductive conditions of commercial invertebrates and algae in the far Eastern seas, Izvestiya TINRO, Vladisvostok, 106, 26-33. [*Canadian Translations of Fisheries and Aquatic Sciences* 5664].

Smith, P.K.. Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochem.*, 150, 76-85.

Söderhäll, K. (1982). Prophenoloxidase activating system and melanization: a recognition mechanism of arthropods. A review. *Dev. Comp. Immunol.*, 6, 601-611.

Söderhäll, K., Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10, 23-28.

Stöcker, W., Raeder, U., Bijolt, M.M., Wichertjes, T., van Bruggen, E.F.J., Markl, J., (1988). The quaternary structure of four crustacean two-hexameric hemocyanins: immunocorrelation, stoichiometry, reassembly and topology of individual subunits. J. Comp. Biochem. Physiol. B, 158, 271–289.

Stoeva, S., Rachev, R., Severov, S., Voelter, W., Genov, N. (1995). Carbohydrate content and monosaccharide composition of *Rapana thomasiana* grosse (Gastropoda) hemocyanin and its structural subunits. Comparison with gastropodan hemocyanins. *J. Comp. Biochem. Physiol. B*, 110, 761-765. Stoeva, S., Schutz, J., Gebauer, W., Hundsdorfer, T., Manz, C., Markl, J., Voelter, W. (1999). Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Biochim. Biophys. Acta*, 1435 (1-2), 94-109.

Spellberg, B., Edwards, J. E., (2001). Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin. Infect. Diseases*, 32, 76-102.

Sugumaran, M. (1996). Roles of the insect cuticule in host defense reactions. In New directions in Invertebrate Immunology. SOS Publications, 355-374.

Swain, S. L., (1993). IL-4 dictates T-cell differentiation. Res. in Immunol., 144, 616-620.

Terwilliger, R. C., Ryan, M., Terwilliger, N. B., Daub. R. (1982). Hemocyanin from the chiton Katharina tunicana. *Amer. Zool.*, 22, 933.

Thornton, D.J., Carlstedt, I., Sheehan, J.K. (1994). Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels. In: Walker JM (ed), *Methods in molecular biology, Basic protein and peptide protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, 32, 119-128.

Tremblay, M.J. (1997). Snow crab (*Chionoecetes opilio*) distribution, limits and abundance trends on the Scotian Shelf. J. Northwest Atlantic Fish. Sci., 21, 7-22.

Tzianabos, A.O. (2000). Polysaccharide immunomodulation as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13, 523-533.

van Holde, K.E., Brenowitz, M. (1981). Subunit Structure and physical properties of the hemocyanin of the giant Isopod Bathynomus giganteus. *Biochemistry*, 20, 5232-5239.

van Holde, K.E., Miller, K.I. (1982). Hemocyanins. Q. Rev. Biophys., 15, 1-129.

van Holde, K.E., Miller, K.I. (1995). Hemocyanins. Adv. Protein Chem., 47, 1-81.

van Holde, K.E., Miller, K.I., Lang, W.H.(1992). Molluscan hemocyanin : structure and function. Adv. Comp. Environm. Physiol., 13, 251-300.

van Holde, K.E., Miller, K.I., Decker, H. (2001). Hemocyanins and invertebrate evolution. J. Biol. Chem., 276, 15563–15566.

van Kuik, J. A., Breg, J., Kolsteeg, C. E. M., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F. G. (1987). Primary structure of the acidic carbohydrate chain of hemocyanin from *Panulirus interruptus. FEBS Lett.*, 221, 150–154.

van Kuik, J.A., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G. (1990). Carbohydrate analysis of hemocyanins Invertebrate Dioxygen Carriers (G. Préaux and R. Lontie, Eds.), Leuven University Press, Leuven, pp. 157-163.

VanDeusen, J.B., Shah, M.H., Becknell, B., Blaser, B.W., Ferketich, A.K., Nuovo, G.J., Ahmer, B.M.M., Durbin, J., Caligiuri, M.A. (2006). STAT-1-mediated repression of monocyte interlukin-10 gène expression in vivo. *Eur. J. Immunology*, 36, 623-630.

Vilasoa-Martínez, M., López-Hernández, J., Lage-Yusty, M. A. (2006). Protein and amino acid contents in the crab, *Chionoecetes opilio*. *Food Chemistry*, 103, 1330-1336.

Voelter, W., Devreese, B., Weser, U., Di Muro, P., Salvato, B., Stevanovic, S., Volbeda, A., Hol, W.G.J. (1989). Crystal structure of hexameric hemocyanin *vulgaris*), *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 87, 996-998.

Weigle, W.O. (1964). Immunochemical properties of hemocyanin. Immunochemistry, 1, 295-302.

Xu, Q.H., Zhao, X.N., Cheng, J-P., Wei, C-H., Zhang, Q-H., Rong, K-T., (2006). Influence of Carrier Proteins on the Immunologic Response to Haptenic Antitetrodotoxin Vaccine. *Bioconjugate Chem.*, 17 (6), pp. 1508–1513.

Yang, Y., Poncet, J., Garnier, J., Zatylny, C., Bachère, E., Aumelas, A. (2003). Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *J. Biol. Chem.*, 278, 36859-36867.

Yu, S.M., Wu, J.F., Lin, T.L., Kuo, S.C. (1997). Inhibition of nitric oxide synthase expression by PPM-18, a novel anti-inflammatory agent, *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. J.*, 328, 363-369.

Yun, J.M., Kwon, H., Hwang, J.K. (2003). In vitro anti-inflammatory activity of panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in RAW 264.7 cells. *Planta Med.*, 69, 1102-1108.

Zacharius, R.M., Tatiana E. Z., Morrison, J.H., Woodlock, J.J., (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 31, 148–152.

Zlateva, T., Di Muro, P., Salvato, B., Beltramini, M., (1996). The o-dephenoloxidase activity of arthropod hemocyanin. *FEBS Lett.*, 384, 251–254.