

Modifications de l'immunité humorale induites par des changements de la gravité

Nathan Guéguinou

▶ **To cite this version:**

Nathan Guéguinou. Modifications de l'immunité humorale induites par des changements de la gravité. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0081 . tel-01749240

HAL Id: tel-01749240
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749240

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

École Doctorale BioSE (Biologie, Santé-Environnement)
Laboratoire Développement et Immunogénétique

PhD-FSTC-2012-21
Unité de Recherche en Sciences de la Vie

THÈSE EN COTUTELLE

Présentée et soutenue publiquement le **11 octobre 2012** pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE
Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

et

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU LUXEMBOURG
En Biologie

par

Nathan GUÉGUINOU
né le 06 novembre 1985 à Grande-Synthe

Modifications de l'immunité humorale induites par des changements de la gravité

Membres du jury

Rapporteurs :	**Dr. Alexander CHOUKÈR**	**Professeur, Université de Munich**
	Dr. Jean-Luc MOREL	**HDR, Université de Bordeaux**
Examinateurs :	**Dr. Lionel DOMENJOUD (président)**	**HDR, Université de Lorraine, Nancy**
	Dr. Paul HEUSCHLING	**Professeur, Université du Luxembourg**
Co-directeurs :	**Dr. Eric TSCHIRHART**	**Professeur, Université du Luxembourg**
	Dr. Jean-Pol FRIPPIAT	**Professeur, Université de Lorraine, Nancy**
Invitée :	**Dr. Guillemette GAUQUELIN-KOCH**	**CNES, Paris**

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord messieurs les Professeurs Jean-Pol Frippiat et Eric Tschirhart de m'avoir encadré et également aidé dans mes démarches administratives et scientifiques durant ces années de thèse.

Je suis très reconnaissant du soutien financier du Fond National de la Recherche (FNR) du Luxembourg sans lequel je n'aurai pas pu mener ces travaux, ainsi que mon employeur, l'Université du Luxembourg. Ces derniers ont également été financés par le centre national d'études spatiales (CNES), l'agence spatiale européenne (ESA), le ministère français de l'enseignement supérieur et de la recherche (MESR) et l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Merci également aux membres du jury d'avoir accepté de consacrer du temps à lire ma thèse ainsi que pour leur présence à ma soutenance.

Je remercie particulièrement les Docteurs Christine Legrand-Frossi, Cécile Huin-Schohn, Matthieu Bascove et Véronique Schenten pour leur soutien technique et scientifique dans l'avancée de ces travaux, ainsi que pour leur gentillesse et leurs précieux conseils.

Je tiens à remercier mes proches, en particulier Emilie qui partage ma vie ; ainsi que mes parents sans qui je n'aurais notamment pas pu effectuer les 5 années d'études supérieures qui ont précédé le début de ma thèse.

Enfin, merci à ceux qui m'ont soutenu et encouragé, surtout durant les périodes difficiles que j'ai pu connaître au cours de ces années de thèse.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

1. Le système immunitaire…….. 3

1.1. L'immunité naturelle ou innée…….. 3
1.1.1. Les barrières physico-chimiques……. 3
1.1.2. La phagocytose……..... 3
1.1.3. Le système du complément……. 5
1.1.3.1. La voie classique……. 5
1.1.3.2. La voie des lectines……. 5
1.1.3.3. La voie alterne…… 6
1.1.3.4. La voie finale commune…….. 6
1.1.3.5. Complément et inflammation…….. 7
1.1.3.6. Régulation du système du complément…….. 7

1.2. L'immunité adaptative ou spécifique……... 8

1.3. Déroulement de la réaction immunitaire adaptative…… 11

1.4. Les anticorps…… 11
1.4.1. Structure…….. 11
1.4.2. Fonctions effectrices des anticorps……. 14
1.4.3. Processus de fabrication des Ac……. 15
1.4.4. Mécanisme de recombinaison V(D)J……. 19
1.4.5. Variabilité générée par la recombinaison V(D)J…… 23
1.4.6. Les mutations somatiques…….. 25
1.4.7. La commutation de classe…….. 27
1.4.8. Formes transmembranaires et sécrétées des anticorps……... 30

1.5. Phylogénie de la réponse humorale…… 33
1.5.1. Apparition de la réponse immunitaire adaptative……. 33
1.5.2. Isotypes d'anticorps chez les vertébrés……. 33
1.5.3. La recombinaison V(D)J dans les différentes classes de vertébrés……... 36
1.5.4. Evolution des hypermutations somatiques et de la commutation de classe.. 37

2. Stress et système immunitaire……. 39

2.1. Le stress…… 39
2.1.1. Historique et définition…… 39
2.1.2. Le syndrome général d'adaptation…….. 41
2.1.2.1. La phase d'alarme…….. 41
2.1.2.2. La phase de résistance…… 42
2.1.2.3. La phase d'épuisement…… 44

2.2. Stress et immunité…… 45
2.2.1. Effets du stress sur les phagocytes…….. 46
2.2.2. Effets du stress sur les cellules NK……. 46
2.2.3. Effets du stress sur les lymphocytes T…… 47
2.2.4. Effets du stress sur les lymphocytes B……. 47
2.2.5. Effets du stress sur les cytokines…….. 47
2.2.6. Effets du stress sur la réactivation de virus latents……... 48
2.2.7. Effets bénéfiques du stress pour le système immunitaire……... 48

3. Effets des vols spatiaux sur le système immunitaire…… 50

3.1. Le vol spatial, source de nombreux stress……. 50

3.2. Impact sur les systèmes biologiques différents du système immunitaire……. 50

3.3. Impact sur le système immunitaire…….. 51

3.3.1. Croissance, résistance et virulence microbienne…… 52

3.3.2. Organes lymphoïdes et sous-populations cellulaires…….. 52

3.3.3. Immunité innée……... 53

3.3.4. Immunité adaptative à médiation cellulaire…… 54

3.3.5. Immunité adaptative à médiation humorale…… 54

PUBLICATION 1…… 59

4. Objectifs…….. 61

RESULTATS

PARTIE 1 : Effets d'un vol spatial sur la réponse immunitaire humorale d'un amphibien adulte..... 67

Changements de l'expression des gènes VH d'anticorps après un séjour de longue durée dans l'espace……. 68

1. Introduction…… 68
2. Nombre de gènes VHII et VHVI présents dans le génome de *P. waltl*……..... 68
3. Gènes VH utilisés lors de la réponse humorale des animaux immunisés…….. 68
4. Expression individuelle des gènes VHVI…….. 69
5. Variabilité des régions CDR3 des réarrangements VHII-D-JH……. 71

PUBLICATION 2…… 73

Baisse de la fréquence des mutations somatiques lors d'un séjour spatial de longue durée..... 75

1. Introduction……..... 75
2. Nombre de mutations dans le gène VHII de *P. waltl*……. 75
3. Fréquence des mutations somatiques……. 75
4. Cause de cette baisse de fréquence des mutations somatiques…….. 76
5. Origine du biais G:C chez les ectothermes…… 77

PUBLICATION 3…… 79

PARTIE 2 : Effets d'un vol spatial sur le développement du système immunitaire humoral d'un amphibien……... 81

Une modification de la gravité affecte la transcription des chaînes lourdes d'IgM durant le développement…….. 82

1. Introduction…… 82
2. Taux de survie et taille des larves…….. 82
3. Etude des transcrits codant les chaînes lourdes d'IgM……... 83
4. Etude de la lymphopoïèse…….. 84
5. Etude de la transduction du signal……. 84
6. Conclusion……. 85

PUBLICATION 4…… 87

Identification du transcrit de la DNA polymérase mu (Polμ) chez *P. waltl* et modulation de son expression suite à des stress rencontrés lors de vols spatiaux…….. 89
1. Introduction…… 89
2. Résultats……. 90
2.1. Identification de deux transcrits codant la Polμ chez *P. waltl*……. 90
2.2. Organisation de l'ARNm Polμ de *P. waltl*……... 90
2.3. Position phylogénétique de Polμ chez *P.waltl*……. 90
2.4. Profil d'expression de l'ARNm de Polμ durant le développement précoce de *P. waltl*……. 91
2.5. Expression de l'ARNm de Polμ dans les organes de *P. waltl* adulte……... 91
2.6. Expression du transcrit Polμ dans les larves de *P. waltl* soumises à différents stress…… 91
3. Discussion…….. 92
3.1. Conservation et structure de la Polμ chez *P. waltl*…….. 92
3.2. Expression des transcrits polμ au cours du développement précoce de *P. waltl* 93
3.3. Expression des transcrits codant la Polμ dans des organes de *P. waltl* adulte 93
3.4. Quantification des transcrits Polμ chez des larves de *P. waltl* ayant subi des stress associés aux vols spatiaux…….. 94
4. Conclusion…… 94

Identification du transcrit de la molécule C3 du complément chez *P. waltl* et étude de son expression suite à des stress rencontrés lors de vols spatiaux…….. 104
1. Introduction……... 104
2. Résultats et discussion……... 106
2.1. Identification de l'ADNc de C3 chez *P. waltl*……. 106
2.2. Expression de C3 durant le développement précoce de *P. waltl*……. 107
2.3. Profil d'expression de l'ARNm C3 chez *P.waltl* adulte……... 107
2.4. Expression des transcrits C3 chez des larves de *P. waltl* exposées à différents stress rencontrés lors d'un vol spatial……... 108
2.5. Expression des transcrits C3 après exposition de souris à 2 modèles d'altération de la gravité……... 109
3. Conclusion……. 110

PARTIE 3 : Effets d'un changement de la gravité sur le système immunitaire murin 119

Réponse au stress et modification du système immunitaire humoral lors d'une augmentation durable de la gravité chez la souris……... 120
1. Introduction…… 120
2. Résultats et discussion……... 120
2.1. Marqueurs de stress physiologiques…….. 120
2.2. Etat d'anxiété des animaux……. 121
2.3. Lymphoprolifération…….. 121
2.4. Cytokines sériques……. 122
2.5. Immunoglobulines sériques……... 123
3. Conclusion……. 123

PUBLICATION 5…… 125

PARTIE 4 : Contremesures pharmacologiques…… 127

Contremeesures pharmacologiques pour contrecarrer les altérations du système immunitaire associées à un vol spatial…….. 128

1. Introduction…….. 128
2. Effets des antioxydants…… 128
3. Effets des nucléotides…….. 129
4. Effets de l'AHCC……. 129
5. Effets de la DHEA……... 130
6. Conclusion……... 130

CHAPITRE DE LIVRE…… 131

CONCLUSION

PERSPECTIVES

ANNEXES

Annexe 1..... 147
Annexe 2…….. 153

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES…… 155

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1	Représentation schématique de l'immunité innée et adaptative……..	4
Figure 2	Cascade d'activation du complément……..	9
Figure 3	Localisation des organes lymphoïdes chez l'homme……..	10
Figure 4	Schéma de l'activation de l'immunité adaptative…….....	12
Figure 5	Schéma de la structure d'un anticorps de type IgG…….....	13
Figure 6	Schéma d'organisation des loci des chaînes d'anticorps…….....	16
Figure 7	Etapes de la recombinaison V(D)J sur les différents loci d'anticorps….....	18
Figure 8	Schéma de la structure du BCR……..	20
Figure 9	Schéma des signaux de recombinaison entre les segments V, (D) et J…..	21
Figure 10	Schéma des étapes de la recombinaison entre 2 segments…….	24
Figure 11	Schéma de l'activation des LB dans un ganglion et centre germinatif…..	26
Figure 12	Schéma des segments C et de la commutation de classe……	29
Figure 13	Schéma de la synthèse de la forme sécrétée ou membranaire d'IgM…….	32
Figure 14	Représentation schématique d'un VLR……..	34
Figure 15	Isotypes d'anticorps selon les espèces……	35
Figure 16	Réaction au stress chez les vertébrés…….	43
Figure 17	Expérience Genesis……	56
Figure 18	Résultats de l'utilisation des VH de l'expérience Genesis (Boxio *et al.*, 2005).	57
Figure 19	Photographie d'un pleurodèle…….	62
Figure 20	Isoformes et organisation de la Polμ chez *P. waltl.*…….	97
Figure 21	Séquences nucléotidique et peptidique de la Polμ chez *P. waltl.*…..……	98
Figure 22	Arbre phylogénétique des polymérases X…….	99
Figure 23	Expression de la Polμ au cours du développement précoce de *P. waltl.*…	100
Figure 24	Expression de la Polμ dans différents organes de *P. waltl* adulte…….	101
Figure 25	Expression de la Polμ suite à l'exposition à différents stress chez *P. waltl*	102
Figure 26	Organisation de C3 chez *P. waltl.*……	112
Figure 27	Arbre phylogénétique des protéines C3, C4 et C5 du complément……	113
Figure 28	Expression de C3 au cours du développement précoce de *P. waltl.*……	114
Figure 29	Expression de C3 dans différents organes de *P. waltl* adulte…….	115
Figure 30	Expression de C3 suite à l'exposition à différents stress chez *P. waltl.*…..	116
Figure 31	Expression de C3 suite à l'exposition à la gravité modifiée chez la souris.	117

Tableau 1	Cytokines et commutation de classe……..	31
Tableau 2	Oligonucléotides utilisés pour l'étude de la Polμ……..	96
Tableau 3	Oligonucléotides utilisés pour l'étude de C3…….	111

ABREVIATIONS

Ac	**A**nti**c**orps
ACTH	**A**dreno**C**ortico**T**rope **H**ormone (hormone adrénocorticotrope)
ADN	**A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique
ADNc	**A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique **c**omplémentaire
Ag	**A**nti**g**ène
AHCC	**A**ctive **H**exose **C**orrelated **C**ompound
AP1	**A**ctivator **P**rotein **1**
ARN	**A**cide **R**ibo**N**ucléique
ARNm	**A**cide **R**ibo**N**ucléique **m**essager
BCR	**B C**ell **R**eceptor (récepteur des cellules B)
BRCT	**Br**east cancer suppressor protein **C**arboxy-**T**erminal
C4BP	**C4 B**inding **P**rotein
CAM	**C**omplexe d'**A**ttaque **M**embranaire
CD	**C**luster of **D**ifferenciation (antigènes leucocytaires)
CH	domaine **C**onstant de la chaîne lourde (**H**eavy)
CL	domaine **C**onstant de la chaîne légère (**L**ight)
CMH	**C**omplexe **M**ajeur d'**H**istocompatibilité
CMV	**C**yto**m**égalo**v**irus
ConA	**Con**canavalin **A** (mitogène des cellules T)
CPA	**C**ellule **P**résentatrice d'**A**ntigène
CREB	CRE-binding protein (CRE = **C**yclic AMP **R**esponsive **E**lement)
CRH	**C**orticotrophin **R**eleasing **H**ormone (corticolibérine)
CSR	**C**lass **S**witch **R**ecombination
D	segment de **D**iversité
Da	**Da**lton
DAF	**D**ecay **A**ccelerating **F**actor
DHEA	**D**é**h**ydro**é**pi**a**ndrostérone
DNA-PKc	**DNA**-Activated **P**rotein **K**inase **c**atalytic polypeptide
EBV	**E**pstein-**B**arr **V**irus
FR	**F**ramework **R**egion
GANP	**G**erminal center-**A**ssociated **N**uclear **P**rotein

GAPDH **G**lycér**a**ldéhyde-3-**p**hosphate **d**és**h**ydrogénase

GH **G**rowth **H**ormone (hormone de croissance)

HEV **H**igh **E**ndothelial **V**einule

HPA **H**ypothalamic-**P**itiutary-**A**drenal (hypothalamo-hypophyso-surrénalien)

HRF **H**omologous **R**estriction **F**actor

HSF **H**eat **S**hock **F**actor (protéine de choc thermique)

HSP **H**eat **S**hock **P**rotein : (protéine de choc thermique)

HSV-1 **H**erpes **S**implex **V**irus-**1**

IFN **I**nter**f**éro**n**

Ig **I**mmuno**g**lobuline

IL **I**nter**l**eukine

ISS **I**nternational **S**pace **S**tation

JH domaine de **J**onction de la chaîne lourde (**H**eavy)

JL domaine de **J**onction de la chaîne légère (**L**ight)

LB **L**ymphocyte **B**

LPS **L**ipo**p**oly**s**accharide

LRR **L**eucine **R**ich **R**egion

LT **L**ymphocyte **T**

MASP **MBL**-**A**ssociated **S**erine **P**rotease

MBL **M**annose-**B**inding **L**ectin

MCP **M**embran **C**ofactor **P**rotein

MCP-1 **M**onocyte **C**hemoattractant **P**rotein-1

MIRL **M**embran **I**nhibitor of **R**eactive **L**ysis (CD59)

MSH **M**ut**S** **H**omolog

NFκB **N**uclear **F**actor of **kappa** light polypeptide gene enhancer in **B**-cells

NGF **N**erve **G**rowth **F**actor

NHEJ **N**on **H**omologous **E**nd **J**oining

NK **N**atural **K**iller

PAMP **P**athogen **A**ssociated **M**olecular **P**attern (structure typique des pathogènes)

PCNA **P**roliferating **C**ell **N**uclear **A**ntigen

PCR **P**olymerase **C**hain **R**eaction

Ph **p**otentiel **H**ydrogène

PKA **P**rotein **K**inase **A**

PKC	**P**rotein **K**inase **C**
Pol	**Pol**ymérase
PRR	**P**athogen **R**ecognition **R**eceptors (récepteurs de reconnaissance des pathogènes)
RACE	**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds
RAG	**R**ecombination **A**ctivating **G**ene
RT	**R**etro**t**ranscription
SI	**S**ystème **I**mmunitaire
SNC	**S**ystème **N**erveux **C**entral
SHM	**S**omatic **H**yper**m**utations (Hypermutations somatiques)
STAT1	**S**ignal Transducer and **A**ctivator of **T**ranscription **1**
TAFII	**T**BP-**A**ssociated **F**actor **II**
TBP	**T**ATA **B**inding **P**rotein
TdT	**T**erminal **d**eoxynucleotidyl **T**ransferase
UTR	**Un**t**r**anslated **R**egion
VH	domaine **V**ariable de la chaîne lourde (**H**eavy)
VL	domaine **V**ariable de la chaîne légère (**L**ight)
VLR	**V**ariable **L**ymphocyte **R**eceptor
VZV	**V**aricella **Z**oster **V**irus

INTRODUCTION

1. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

Durant toute sa vie, un organisme est en contact avec des éléments de l'environnement susceptibles de menacer son intégrité. Ces éléments, étrangers à l'organisme (non-soi) et appelés antigènes, sont par exemple des virus, des bactéries ou des champignons microscopiques.

Pour parer à l'agression de ces antigènes, les vertébrés utilisent leur système immunitaire. Celui-ci est capable de différencier les éléments du soi (de l'organisme) de ceux du non-soi. Il existe plusieurs niveaux de réponses du système immunitaire chez les vertébrés, on distingue ainsi deux « types » d'immunité : innée et adaptative (**fig. 1**).

1.1. L'immunité naturelle ou innée

C'est la première ligne de défense contre les éléments du non-soi. Elle agit indépendamment de la nature de l'antigène et ne s'améliore pas lors d'un nouveau contact avec le même agent pathogène. Cette immunité naturelle est assurée par plusieurs éléments de l'organisme.

1.1.1 Les barrières physico-chimiques

La peau est une barrière physique solide protégée par des cellules kératinisées. Son pH légèrement acide n'y favorise pas la prolifération de nombreux pathogènes (bactéries, champignons).

Les muqueuses du tractus respiratoire, intestinal et uro-génital assurent également une protection en sécrétant du mucus qui permet « d'engluer » les microorganismes par sa viscosité et de les détruire par la présence d'enzymes (lysozyme présent dans la salive et les larmes qui a pour rôle d'hydrolyser les glycosaminoglycanes constituant la paroi des bactéries $GRAM^+$). De plus, le tractus gastro-intestinal est un environnement peu propice au développement des pathogènes (pH très acide).

1.1.2 La phagocytose

Les cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles et monocytes du sang ou macrophages des tissus) qui sont capables d'internaliser et de détruire l'agent étranger et ainsi permettre son élimination de l'organisme. En effet, ces cellules reconnaissent les agents du non-soi grâce à des récepteurs PRR (Pathogen Recognition Receptors) capables de

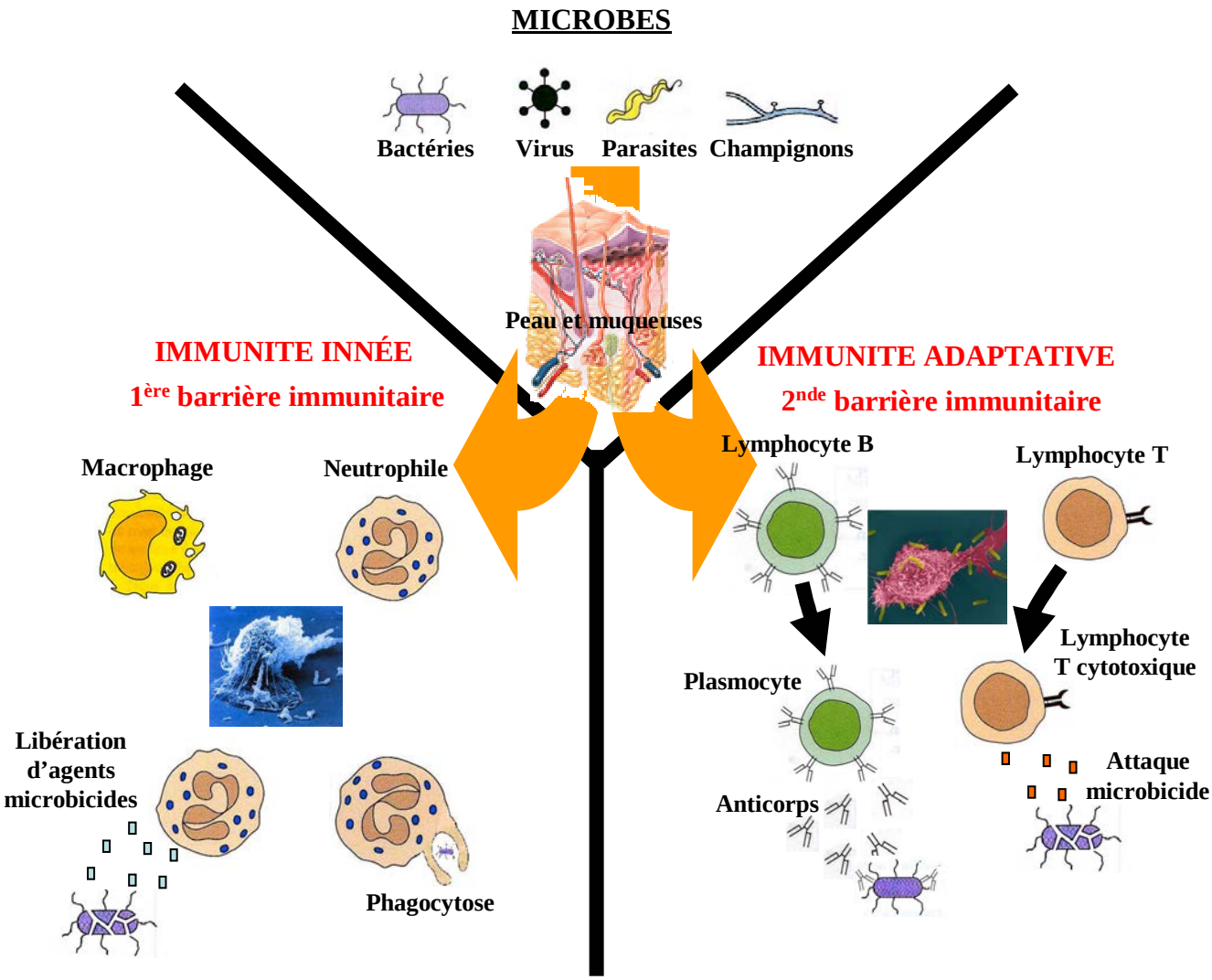


Figure 1. Représentation schématique des différentes lignes de défense d'un organisme contre les microbes.

reconnaître des structures typiques des pathogènes, appelés PAMP (Medzhitov & Janeway, 1997).

1.1.3 Le système du complément

Découvert il y a plusieurs décennies, le système du complément est un ensemble d'environ trente protéines synthétisées très majoritairement par les hépatocytes. Faisant partie de l'immunité innée par la capacité de ces protéines à reconnaître une cible de façon non spécifique, le complément favorise l'inflammation mais peut également directement lyser le pathogène, recouvrir (opsoniser) le pathogène afin de faciliter la phagocytose ou encore augmenter la capacité d'élimination des complexes immuns (Ag-Ac) lors d'une réponse immunitaire adaptative.

Trois voies d'activation du complément sont connues : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne. Chaque voie est activée par des composants chimiques propres. La mise en œuvre de chacune de ces voies provoque une activation successive des protéines plasmatique du système par protéolyse. Ces trois voies convergent toutes vers l'activation par protéolyse de la protéine centrale de ce système, C3. Une fois clivée, cet élément est à l'origine des différentes fonctions assurées par les protéines du complément (opsonisation, inflammation, lyse).

1.1.3.1 La voie classique

La voie classique est initiée par la fixation de la protéine C1q aux domaines constants de certaines immunoglobulines (par exemple le domaine CH2 des IgG ou le domaine CH4 des IgM) de complexes-immuns. Cette reconnaissance provoque l'auto-activation de C1r (une sérine-estérase associée à C1q) qui clive alors C1s, une troisième protéine associée à C1q. Une fois activée, cette dernière est capable de cliver le composant C4 en C4a et C4b. Le composant C2 peut alors s'associer à C4b et être clivé à son tour en C2a et C2b. Il se forme alors un complexe entre C4b et C2a (C4b2a) qui est fixé à la membrane de la cellule-cible de l'anticorps. Ce complexe est capable de cliver la molécule C3, c'est la C3 convertase de la voie classique.

1.1.3.2 La voie des lectines

La voie des lectines est quant à elle mise en place lorsque des microorganismes sont reconnus par des protéines « homologues » aux protéines du complexe C1 (C1q, C1r et C1s). En effet, la protéine MBL (Mannose-Binding Lectin) est capable de reconnaître les

protéoglycanes contenant du mannose à la surface des microorganismes, permettant ainsi l'auto-activation de 2 protéines associées à MBL et présentant une forte homologie avec C1r et C1s, respectivement MASP 1 et MASP 2 (MBL-Associated Serine Proteases). Une fois activée, MASP2 a la capacité de cliver le composant C4 en C4a et C4b (de la même manière que C1s dans la voie classique). Ensuite, C4b va pouvoir cliver C2 en C2a et C2b. La C3 convertase (C4b2a) est alors formée.

1.1.3.3 La voie alterne

La voie alterne est mise en place suite à la reconnaissance de structures polysaccharidiques présentes à la surface d'agents pathogènes tels que le lipopolysaccharide (LPS) et l'acide teichoïque des bactéries ou le zymosan de la paroi des levures. D'autres structures semblables (l'inuline ou l'agar des plantes), certains virus ou même des cellules du soi infectées ou transformées sont capables d'activer cette voie alterne.

La mise en place de cette voie nécessite d'abord un clivage de C3 en C3a et C3b, puisque cette voie est en fait une voie d'auto-amplification du clivage de C3. En effet, la C3 convertase de la voie alterne ne peut se former qu'à partir du fragment C3b. Celui-ci se lie alors au facteur B pour former le complexe C3bB. Ce facteur est alors clivé par le facteur D en fragments Ba et Bb. Le fragment Ba s'exclut du complexe qui devient alors C3bBb, qui sera ensuite stabilisé par la properdine (facteur P). Ce complexe est la C3 convertase de la voie alterne, capable de cliver C3 de façon identique à la C3 convertase de la voie classique (clivage aboutissant à la formation de C3a et C3b). Cette voie est ainsi très importante pour la reconnaissance et l'élimination des pathogènes en l'absence d'anticorps, au contraire de la voie classique. L'auto-amplification de cette voie est primordiale pour recouvrir la surface du pathogène de la molécule C3b (opsonisation) et faciliter ainsi son élimination de l'organisme.

1.1.3.4 La voie finale commune

Lors de l'activation des voies du complément aboutissant à la formation des C3 convertases de la voie classique (C4b2a) ou de la voie alterne (C3bBb), une partie de ces molécules reste associée à C3b, suite au clivage de C3, pour former respectivement les complexes C4b2a3b (C5 convertase de la voie classique) et C3bBb3b (C5 convertase de la voie alterne). Ces 2 convertases de C5 ont pour fonction le clivage de C5 en C5a et C5b. Une molécule de C5b peut alors s'associer à une molécule de C6 (C5b6) qui s'associe à son tour à une molécule de C7 (C5b67), puis à une molécule de C8 (C5b678). Ce dernier complexe va alors pouvoir s'ancrer dans la membrane de la cellule-cible et recruter des molécules de C9

capables de polymériser (jusqu'à 18 molécules de C9) dans la membrane de la cellule-cible afin de former un pore. Ce complexe $C5b5789_{(1\text{-}18)}$ est appelé le complexe d'attaque membranaire (CAM), responsable de la lyse de la cellule-cible (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1991 ; Esser, 1991).

1.1.3.5 Complément et inflammation

Les petits fragments solubles libérés lors des clivages protéiques des éléments du complément C4a, C2b, C3a ou C5a jouent un rôle dans l'inflammation. En effet, C4a, C3a et C5a sont des anaphylatoxines, c'est-à-dire des protéines pro-inflammatoires capables d'induire l'anaphylaxie. Parmi ces 3 facteurs, C3a et surtout C5a sont les plus puissants, puisque capables d'attirer les polynucléaires neutrophiles, les monocytes ou les macrophages sur le site d'activation du complément (Frank & Fries, 1991). Ces anaphylatoxines induisent notamment la dégranulation des mastocytes et des polynucléaires basophiles, libérant des amines vasoactives telles que l'histamine qui augmentent la perméabilité vasculaire. Cette réaction facilite alors le passage d'anticorps, de protéines du complément ou de phagocytes au niveau du foyer infectieux. Ces petites protéines peuvent aussi se fixer sur leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales vasculaires ainsi que sur les plaquettes pour les activer. De plus, elles peuvent induire la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL1 et IL6) en se fixant à la surface des monocytes.

C2b n'est pas une anaphylatoxine proprement dite mais est un précurseur de la kinine C2 vasoactive (par clivage). Elle est responsable de la dilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, favorisant la réaction inflammatoire.

En plus des anaphylatoxines, les complexes C5b67 ou C5b678 formés à la surface de la cellule-cible à lyser sont capables d'hydrolyser des phospholipides membranaires et d'induire la transduction du signal en favorisant la production de certaines cytokines inflammatoires.

1.1.3.6 Régulation du système du complément

A chaque étape de la cascade d'activation de ces 3 voies ou de la voie commune finale, des protéines inhibitrices peuvent réguler la cascade protéolytique. Par exemple, la voie classique est régulée par deux protéines inhibant respectivement l'auto-activation de C1 en dissociant les protéines C1r et C1s de C1q, grâce à la protéine C1-inh (C1-inhibitor) et la disponibilité de C4b grâce à une protéine de liaison à C4 (C4BP) qui recrute le facteur I et

son cofacteur membranaire MCP (Membran Cofactor Protein), responsables de l'inactivation de C4b par clivage.

En ce qui concerne la voie alterne, le facteur H entre en compétition avec le facteur B pour inhiber la formation de la C3 convertase alterne, favoriser la dissociation des éléments de cette convertase (C3b et Bb) et empêcher ainsi l'auto-amplification de cette voie. La protéine membranaire DAF (Decay Accelarating Factor) est un régulateur négatif des C3 et C5 convertases en accélérant la dissociation des protéines des complexes formant ces convertases. Le facteur I, avec son cofacteur MCP, inactive par clivage les protéines C4b et C3b. Enfin, lors de la formation du CAM, le complexe C5b67 est contrôlé par la protéine S (vitronectine) et le complexe C5b678 est sous le contrôle des protéines MIRL (Membrane Inhibitor of Reactive Lysis) et HRF (Homologous Restriction Factor), inhibant la polymérisation de C9. Il existe également des mécanismes d'endocytose ou d'exocytose permettant l'élimination des fragments de membranes cellulaires contenant un ou plusieurs CAM.

La **figure 2** schématise les 3 voies d'activation de la cascade du complément ainsi que les protéines régulatrices.

1.2. L'immunité adaptative ou spécifique

C'est la seconde ligne de défense contre les éléments du non-soi. Elle est mise en place lorsque l'immunité naturelle ne suffit plus contre le ou les pathogènes. Elle est médiée par les lymphocytes dont la production est assurée dans les organes lymphoïdes primaires et l'activation par l'antigène a lieu dans l'un des organes lymphoïdes secondaires (**fig. 3**). L'immunité adaptative comprend d'une part l'immunité à médiation cellulaire qui met en jeu les lymphocytes T (LT, produits dans le thymus chez les vertébrés) et d'autre part l'immunité à médiation humorale qui met en jeu les lymphocytes B (LB, produits dans la moelle osseuse chez les vertébrés) et les anticorps. Cette immunité adaptative permet l'identification et l'élimination de l'agent du non soi :

- directement par l'activation du système du complément ce qui aboutit à la lyse microbienne,
- en facilitant la phagocytose par les macrophages après fixation par un anticorps spécifique d'un antigène présent à la surface du pathogène,
- en lysant la cellule étrangère grâce à des cellules tueuses qui libèrent des substances cytotoxiques.

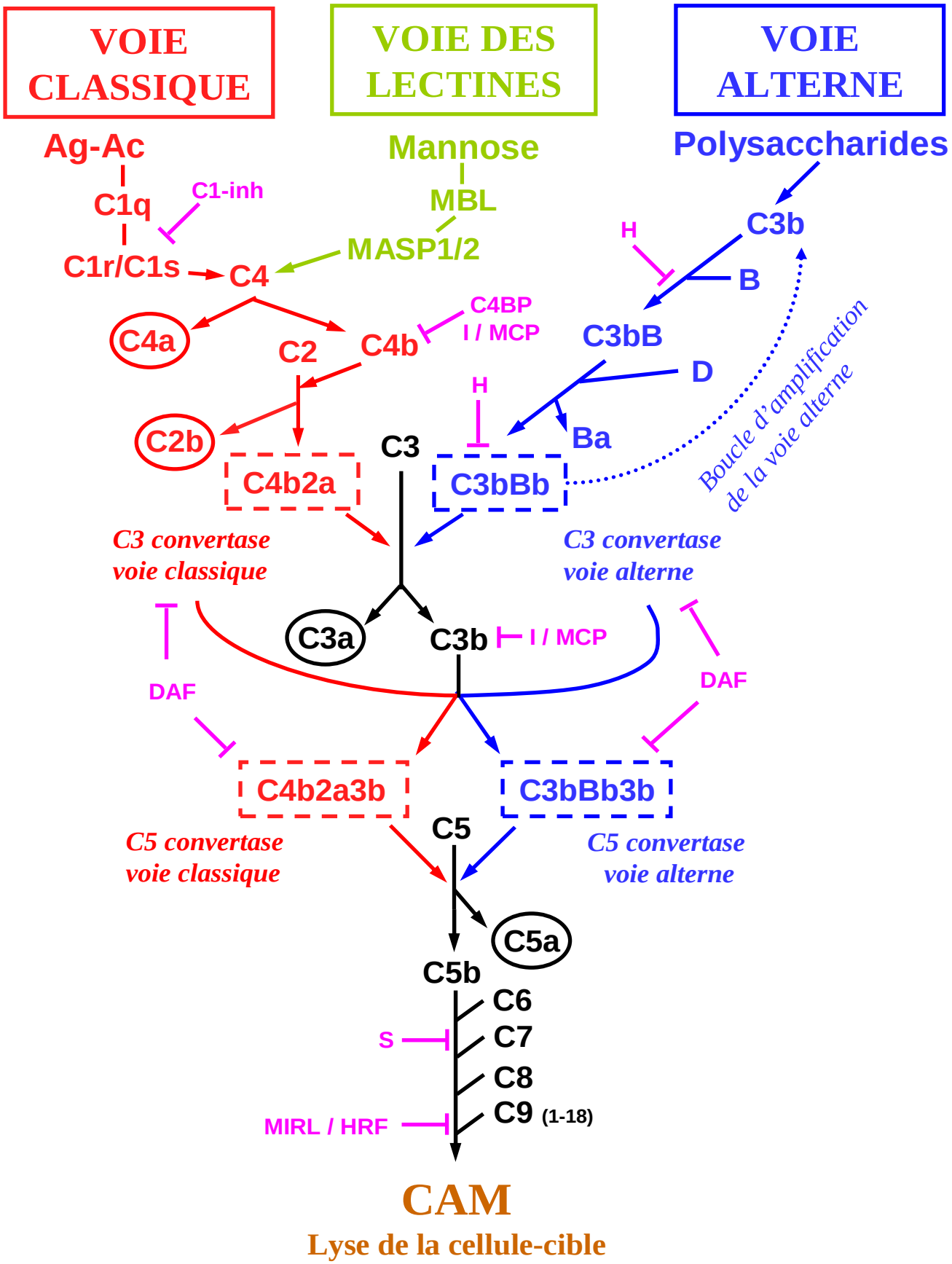


Figure 2. Cascade d'activation des protéines du complément et leurs régulations. En rouge, en vert et en bleu sont représentées respectivement les protéines de la voie classique, de la voie des lectines et de la voie alterne. En noir sont représentées les protéines de la voie commune. Les protéines régulant les réactions de cette cascade sont indiquées en mauve. Les éléments entourés sont les médiateurs de la réponse inflammatoire.

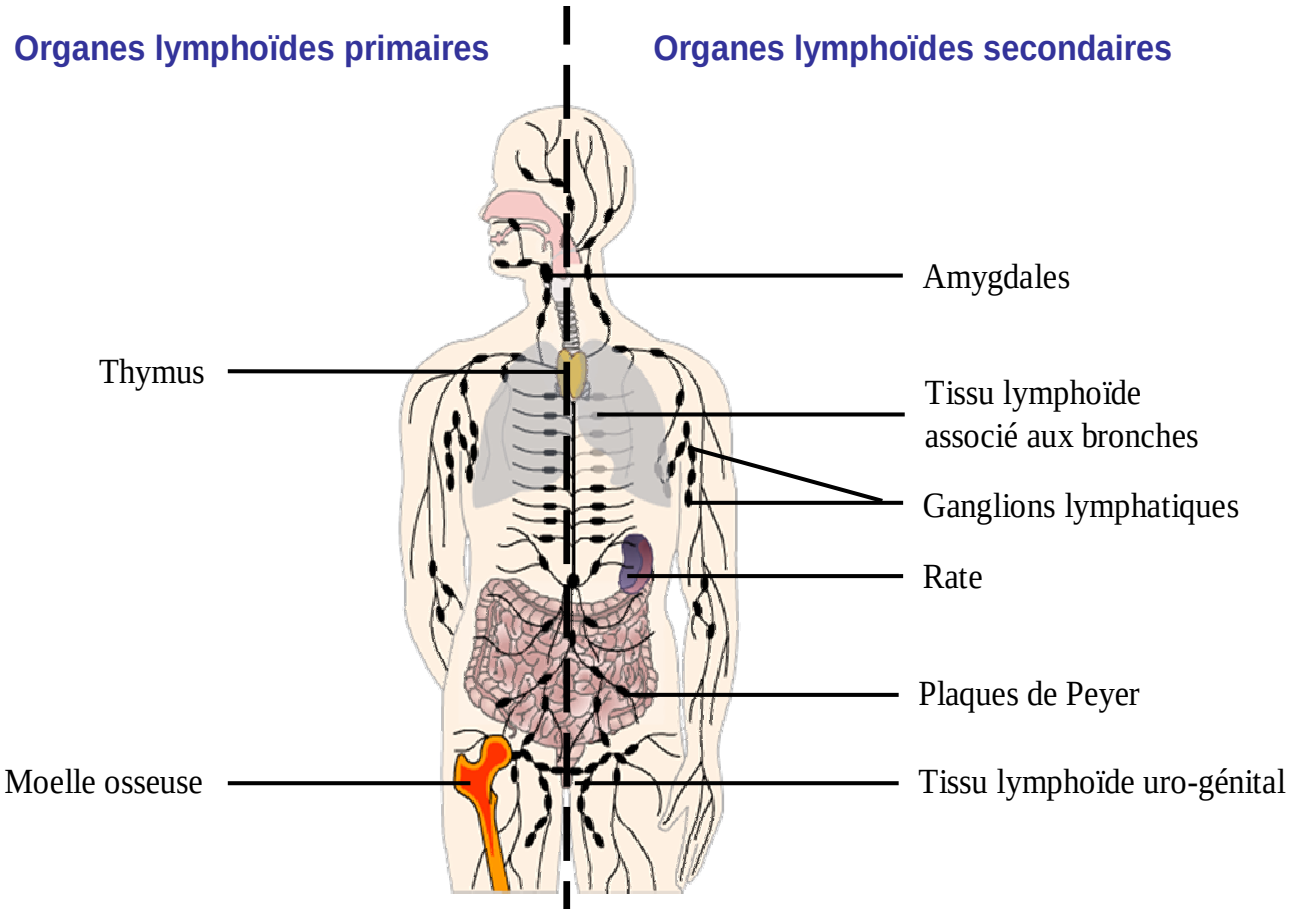


Figure 3. Localisation anatomique des différents organes lymphoïdes chez l'homme.

1.3. Déroulement de la réaction immunitaire adaptative

Lors de l'intrusion dans l'organisme, l'antigène sera reconnu et internalisé par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui vont découper l'antigène puis « présenter » ses fragments aux lymphocytes. Cet antigène présenté à la surface de la CPA est reconnu spécifiquement par les lymphocytes T $CD4^+$, dont l'activation conduit à la stimulation des lymphocytes B et/ou des lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$, dont le rôle est la destruction directe par nécrose ou apoptose des cellules infectées. Ces deux voies sont régulées par les lymphocytes T $CD4^+$, qui sécrètent de nombreuses cytokines. Schématiquement, on distingue les lymphocytes Th1, sécréteurs d'IL2 et d'IFNγ, qui conduisent à l'activation des T cytotoxiques, et les lymphocytes Th2, sécréteurs d'IL4 et d'IL10, qui activent les lymphocytes B. Ces derniers vont alors se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Ces Ac sont spécifiquement dirigés contre l'antigène présenté et vont faciliter l'élimination de cet antigène en le fixant et en facilitant sa reconnaissance par les macrophages (**fig. 4**).

Lors d'une infection, les lymphocytes vont se différencier en cellules effectrices à action immédiate ou en cellules mémoires, qui, lors d'une future intrusion du même antigène, seront sollicitées plus rapidement.

Mon travail de thèse a porté sur l'étude de l'immunité humorale (c'est-à-dire les LB et les anticorps) lors de changements gravitationnels, c'est pourquoi je me focaliserai sur cet aspect de l'immunité dans la suite du manuscrit.

1.4. Les anticorps

1.4.1. Structure

Les anticorps, ou immunoglobulines (Ig), sont des glycoprotéines constituées de quatre chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (chaînes **H**, **H**eavy) identiques et 2 chaînes légères (chaînes **L**, **L**ight) identiques, reliées entre elles par des ponts disulfures. Ces 4 chaînes sont assemblées au sein d'une structure en forme de « Y » (**fig. 5**). Chaque chaîne est constituée d'un domaine variable (V) en N-terminal et un (cas de chaînes légères) ou plusieurs (cas des chaînes lourdes) domaines constants (C) en C-terminal.

Les chaînes lourdes possèdent un domaine de jonction (JH) et un domaine de diversité (D) situés entre le domaine VH et les domaines CH. Les chaînes légères ne possèdent qu'un domaine JL entre les domaines VL et le domaine CL. Les domaines VH, D et JH forment la région variable de la chaîne lourde et les domaines VL et JL forment la région variable de la chaîne légère. Pour chaque chaîne, cette région variable est composée de 3 régions

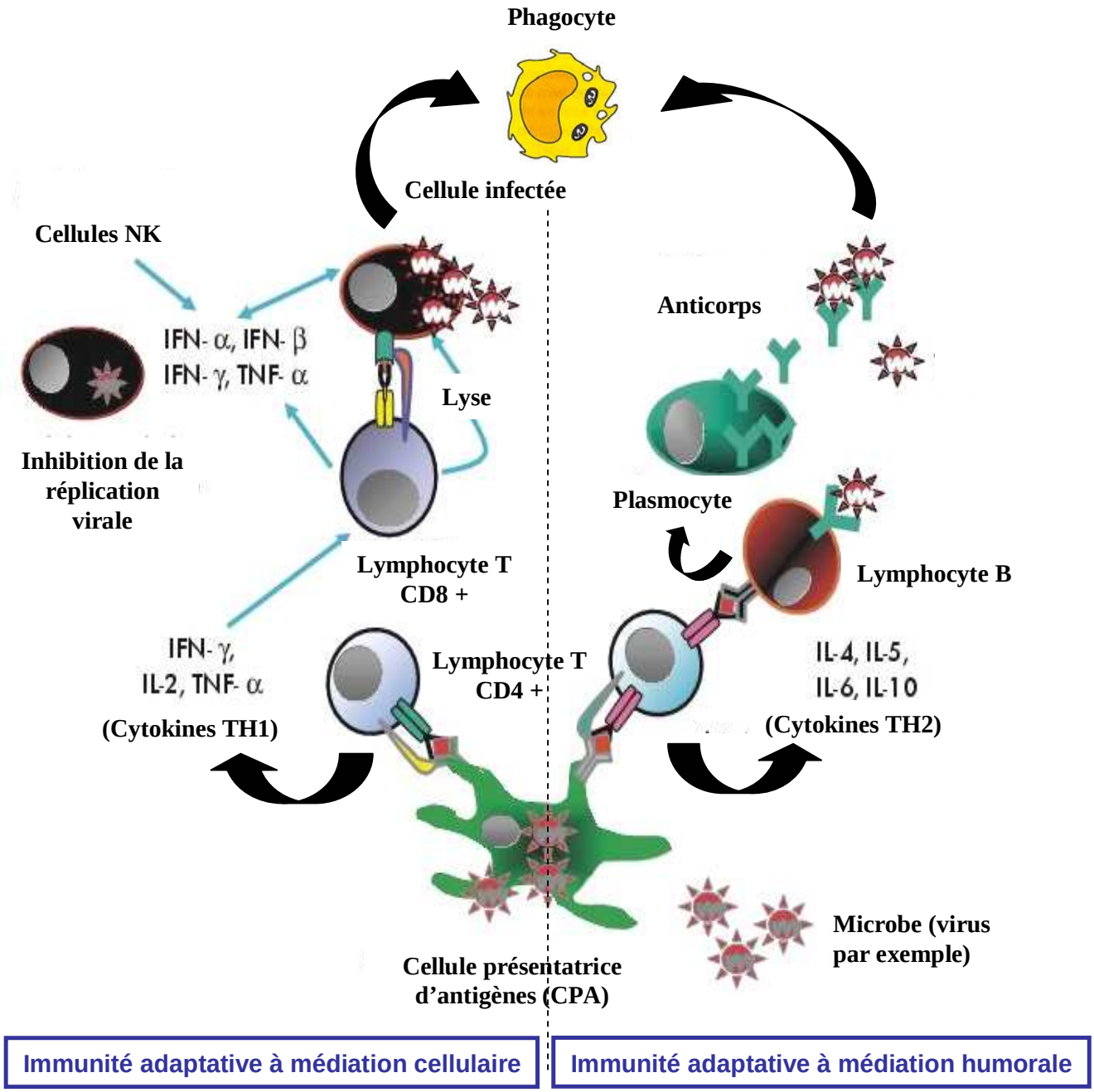


Figure 4. Schéma général de l'activation du système immunitaire adaptatif.
La cellule présentatrice d'antigène (CPA) internalise l'antigène pour le présenter aux lymphocytes T $CD4^+$. Ceux-ci libèrent deux types de cytokines : d'une part les cytokines TH1, permettant d'activer les lymphocytes T $CD8^+$ responsables de la lyse des cellules infectées et de la limitation de la prolifération virale; d'autre part les cytokines TH2, permettant d'activer les lymphocytes B produisant alors des anticorps neutralisant l'antigène. Figure adaptée de Vincent Leroy (2008).

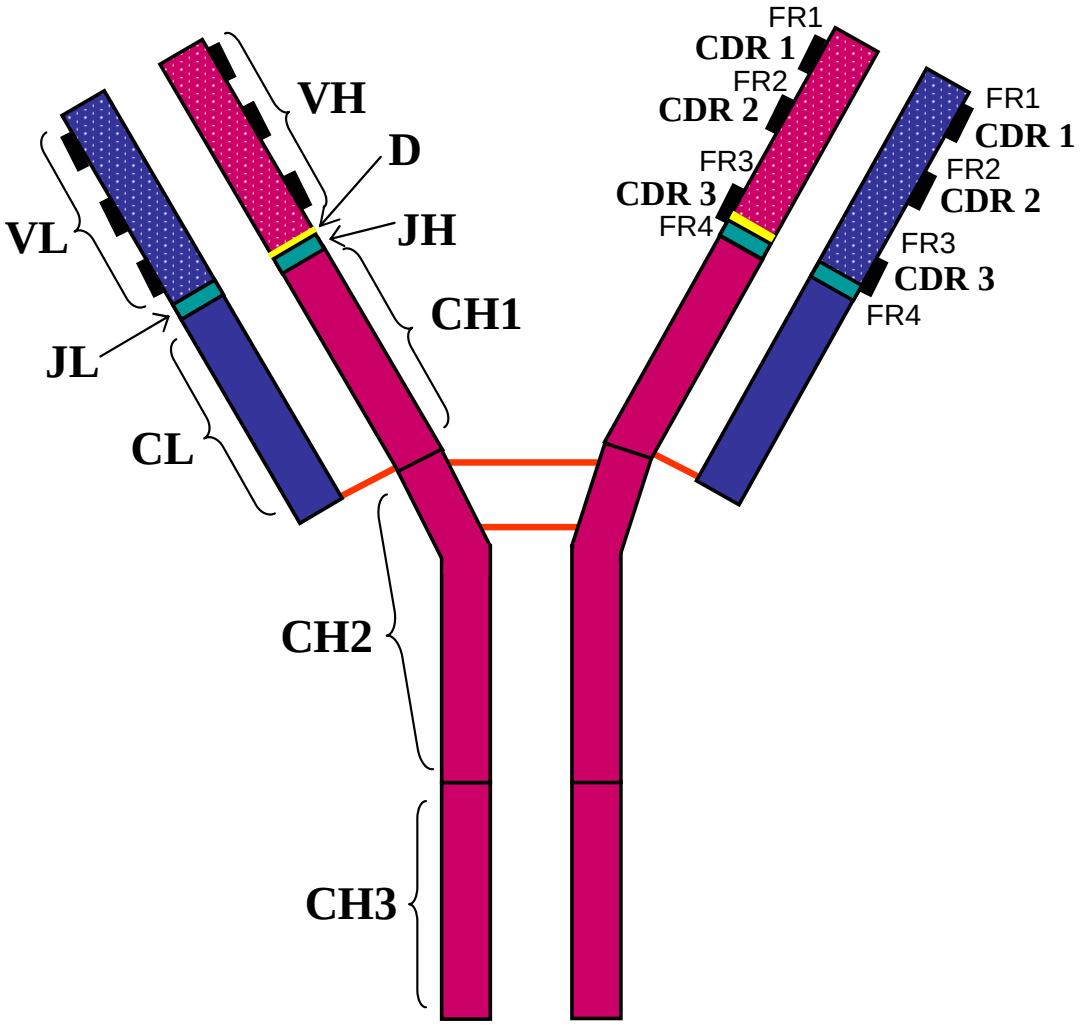


Figure 5. Structure d'un anticorps de type IgG. Les chaînes lourdes sont représentées en rose. Les chaînes légères sont en bleu.
VL: domaine variable des chaînes légères.
VH: domaine variable des chaînes lourdes.
CL: domaine constant des chaînes légères.
CH: domaines constants des chaînes lourdes.
D: segment de diversité des chaînes lourdes.
JL: segment des jonction des chaînes légères.
JH: segment de jonction des chaînes lourdes.
Les traits gras noirs représentent les régions hypervariables de l'anticorps appelées CDR (Complementary Determining Regions). Elles sont séparées par des régions d'ossatures (FR : Framework Regions).
Les chaînes sont liées par des ponts disulfures (traits rouges).
Les différents isotypes se distinguent par la nature des domaines CH des chaînes lourdes. Notons que chez les mammifères, et les IgG, A et D ont 3 domaines CH, les IgM et les IgE en ont 4.

hypervariables appelées CDR (Complementary Determining Region) séparées par des régions d'ossatures moins variables appelées FR (Framework Region). Les 3 CDR de la région variable de la chaîne lourde et les 3 CDR de la région variable de la chaîne légère forment le site de liaison à l'antigène, nommé « paratope » (**fig. 5**). C'est la grande variabilité des CDR qui permet la reconnaissance d'un très grand nombre de structures antigéniques présentes dans la nature.

Il existe 2 types de chaînes L, kappa (κ) et lambda (λ), codées par des gènes distincts. Les chaînes κ sont majoritairement exprimées. Chez l'homme, κ représente 60% des chaînes L et 95% chez la souris (Combriato & Klobeck, 2002). L'expression des chaînes κ ou λ varie donc d'une espèce à l'autre. Etant communes à tous les anticorps, ces chaînes L ne déterminent pas l'isotype.

L'isotype de l'anticorps est déterminé par les régions constantes des chaînes lourdes. L'homme, comme tous les mammifères, possède 5 isotypes d'anticorps : IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Le domaine constant de la chaîne lourde est appelé respectivement Cμ, Cδ, Cγ, Cε et Cα. Il existe 4 sous-classes d'IgG notées IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 ainsi que 2 sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2), qui sont définis par les domaines constants des chaînes lourdes Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cα1 et Cα2, respectivement. Les autres isotypes (IgM, IgD et IgE) ne possèdent pas de sous-classe.

D'un point de vue structural, les IgM membranaires, les IgG, D et E sont des monomères, les IgA des dimères (2 monomères reliés par une pièce sécrétoire et une chaîne J) et les IgM sécrétés des pentamères (5 monomères reliés entre eux par une chaîne J également).

1.4.2. Fonctions effectrices des anticorps

Chez les mammifères, les 5 isotypes d'anticorps ont tous des rôles biologiques différents. Ainsi, les IgM sont sécrétés lors de la 1^{ere} rencontre d'un lymphocyte avec un antigène et favorisent l'activation du complément. La forme membranaire existe à la surface des LB naïfs (c'est-à-dire n'ayant jamais rencontré un Ag), tout comme les IgD dont le rôle n'est aujourd'hui pas encore clairement défini (Edholm *et al.*, 2011).

Les IgG sont synthétisés lors d'une nouvelle rencontre des lymphocytes mémoires avec un antigène déjà présenté et peuvent, selon l'isotype, faciliter l'opsonisation (IgG1 surtout), sensibiliser les cellules-cibles à l'effet cytotoxique des cellules NK (IgG1 et IgG3) ou encore activer les éléments du complément (IgG1 et IgG3 principalement).

Les IgE ont un rôle dans la sensibilisation des mastocytes et des basophiles et favorisent leur dégranulation lors de la réaction à un antigène allergène. Ils sont donc impliqués dans les réactions d'hypersensibilité et sont également sollicités lors de la défense de l'organisme contre des parasites tels que les helminthes.

Enfin, les IgA se retrouvent au niveau des muqueuses sous forme de dimères afin de pouvoir résister aux protéases du mucus et ont une capacité de neutralisation des antigènes. Ils sont capables de transporter l'antigène à travers un épithélium en vue de sa destruction par le système du complément et/ou les phagocytes.

1.4.3. Processus de fabrication des Ac

Le locus du gène codant les chaînes lourdes (situé sur le chromosome 14 chez l'homme) et les loci des gènes codant chacune des deux chaînes légères (situés sur chromosome 2 humain pour la chaîne légère κ et sur le chromosome 22 humain pour la chaîne λ) sont organisés de manière particulière. Chaque locus est composé de plusieurs segments géniques dont il existe quatre types : V (Variable), D (Diversité), J (Jonction) et C (Constant) codant chacun un domaine de la chaîne polypeptidique d'anticorps. Le mécanisme permettant d'aboutir à l'expression d'une chaine d'anticorps a été décrit pour la première fois en 1983 (Tonegawa, 1983). Pour chacun des locus, il y a recombinaison au niveau de l'ADN entre un segment V, un segment D (pour la chaîne lourde uniquement) et un segment J, avant toute transcription de l'ADN. Le nombre de segments varie en fonction du domaine pour lequel ils codent. Par exemple, chez l'homme, il existe au niveau du locus de la chaîne lourde 125 segments V dont environ 40 sont fonctionnels, 27 segments D dont 23 sont fonctionnels et 9 segments J dont 6 sont fonctionnels (**fig. 6**). Il est à noter qu'il existe un classement des différents segments V de la chaîne lourde ou des chaînes légères en familles, selon leur homologie de séquence au niveau de l'ADN. Des segments avec au moins 75% d'homologie de séquence sont considérés comme appartenant à une même famille. Ainsi, par exemple, il y a 7 familles VH chez l'homme, et 16 familles VH chez la souris. Contrairement aux segments C des chaînes légères κ ou λ, les segments C de la chaîne lourde déterminent l'isotype. Il existe, chez l'homme, 1 segment Cμ, 1 segment Cδ, 4 segments Cγ,1 segment Cε et 2 segments Cα ; codant respectivement les isotypes M, D, G, E et A (**fig. 6**).

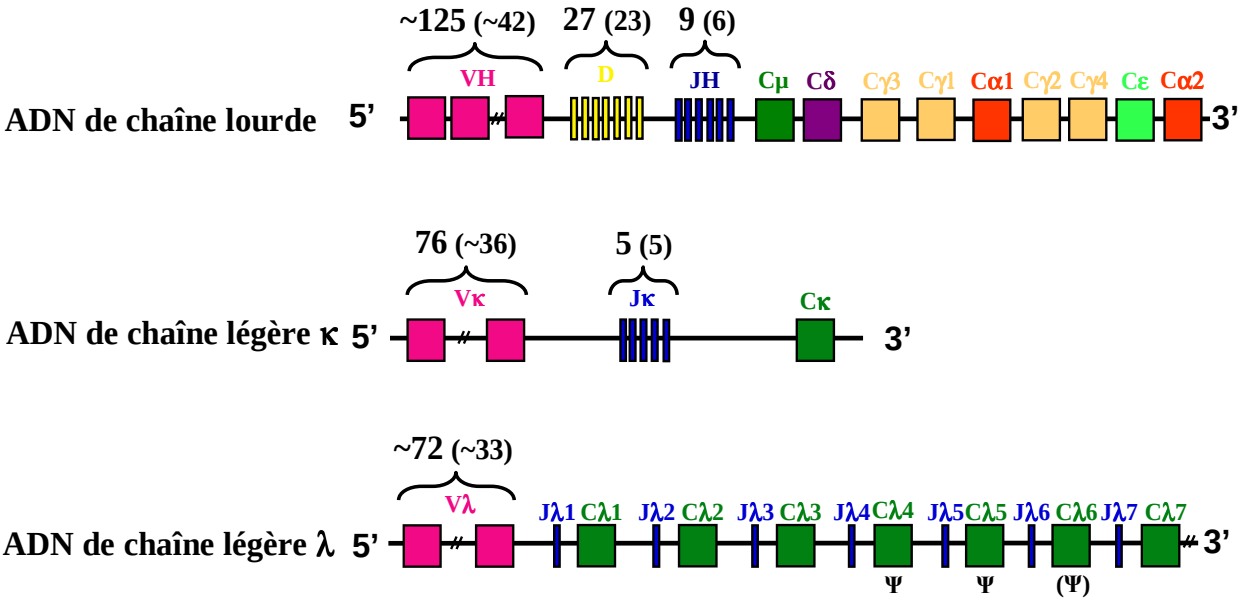


Figure 6. Schéma d'organisation des gènes codant la chaîne lourde et les chaînes légères d'anticorps chez l'homme. Est indiqué le nombre de segments V, D ou J présents sur chaque locus, avec en parenthèses, le nombre de ces segments fonctionnels.
- Sur le locus de la chaîne lourde, il y a environ 125 segments V dont ~42 sont fonctionnels, 27 segments D dont 23 fonctionnels et 9 segments J dont 6 fonctionnels.
- Sur le locus de la chaîne légère κ, il y a environ 76 segments V dont la moitié est fonctionnelle et 5 segments J, tous fonctionnels.
- Enfin, sur le locus de la chaîne légère λ, il y a environ 72 segments V dont la moitié est fonctionnelle et 7 à 11 « clusters » Jλ-Cλ dont seuls 4 sont fonctionnels, les autres étant des pseudogènes (Ψ).
Les distances entre les différents segments ne sont pas à l'échelle.

Lors de la différenciation des cellules souches lymphoïdes de la moelle osseuse en lymphocytes B se déroule l'assemblage, au niveau de l'ADN, d'un segment V, d'un segment D (pour la chaîne lourde uniquement) et d'un segment J par recombinaison, ce qui va former un gène prêt à être transcrit puis traduit en une chaîne polypeptidique. Les segments C ne recombinent pas durant ce processus (ils recombineront lors d'une 2^{e} stimulation antigénique dans pour effectuer la commutation de classe). C'est le locus du gène codant la chaîne lourde qui va voir son ADN recombiné en premier. Comme le montre la **figure 7**, dans une cellule précurseur de LB de la moelle osseuse, au stade « pro-B », il y a tout d'abord association d'un segment D avec un segment JH. Puis un segment VH sera associé à l'ensemble [D-JH]. Ce produit VH-D-JH, caractéristique d'une cellule au stade « pré-B », sera traduit en ARN prémessager, puis après épissage (qui permet d'éliminer les éventuels segments JH « superflus ») en ARN messager. Cet ARNm sera alors traduit (Tonegawa, 1983). Dans une cellule pré-B, c'est toujours le segment Cμ qui sera d'abord traduit parmi les différents segments C. L'expression peptidique de ce gène à la surface d'une cellule pré-B forme le récepteur pré-B, composé alors uniquement de chaînes lourdes d'IgM associées à des substituts de chaînes légères (assemblage de V pré-B et de λ5, **fig. 7**). La présence de ce récepteur pré-B inhibe les réarrangements des segments VH, D et JH de la chaîne lourde du chromosome homologue de la cellule (c'est le phénomène d'exclusion allélique). De cette manière, chaque cellule B n'exprime qu'une seule sorte de chaîne lourde.

L'expression de la chaîne lourde permet ensuite le réarrangement des segments géniques de la chaîne légère κ. Les chaînes légères ne possédant pas de segment D, un des segments Vκ s'associe directement à un des 5 segments Jκ. L'ARN prémessager suivant cette recombinaison est épissé pour ôter les segments Jκ « superflus ». Il n'existe qu'un seul segment Cκ. L'ARNm est ensuite traduit (Zachau, 1993 ; **fig. 7**). Si le réarrangement de ce gène n'aboutit pas à une protéine fonctionnelle, il y a alors réarrangement des segments géniques pour exprimer la chaîne λ (Hieter *et al.*, 1981 ; Korsmeyer *et al.*, 1981). La recombinaison au niveau de ce locus est un peu différente : en effet, celle-ci va associer un segment Vλ directement avec un des couples [Jλ-Cλ], car l'organisation des segments Jλ et Cλ de ce locus est en « cluster », contrairement à l'organisation des segments de la chaîne κ ou de la chaîne lourde. Le mécanisme privilégiant d'abord la recombinaison du gène codant la chaîne légère κ n'est pas absolu car une étude menée sur les cellules B de moelle osseuse fœtale humaine a montré que les 2 types de chaînes légères peuvent être exprimées simultanément (Pauza *et al.*, 1993).

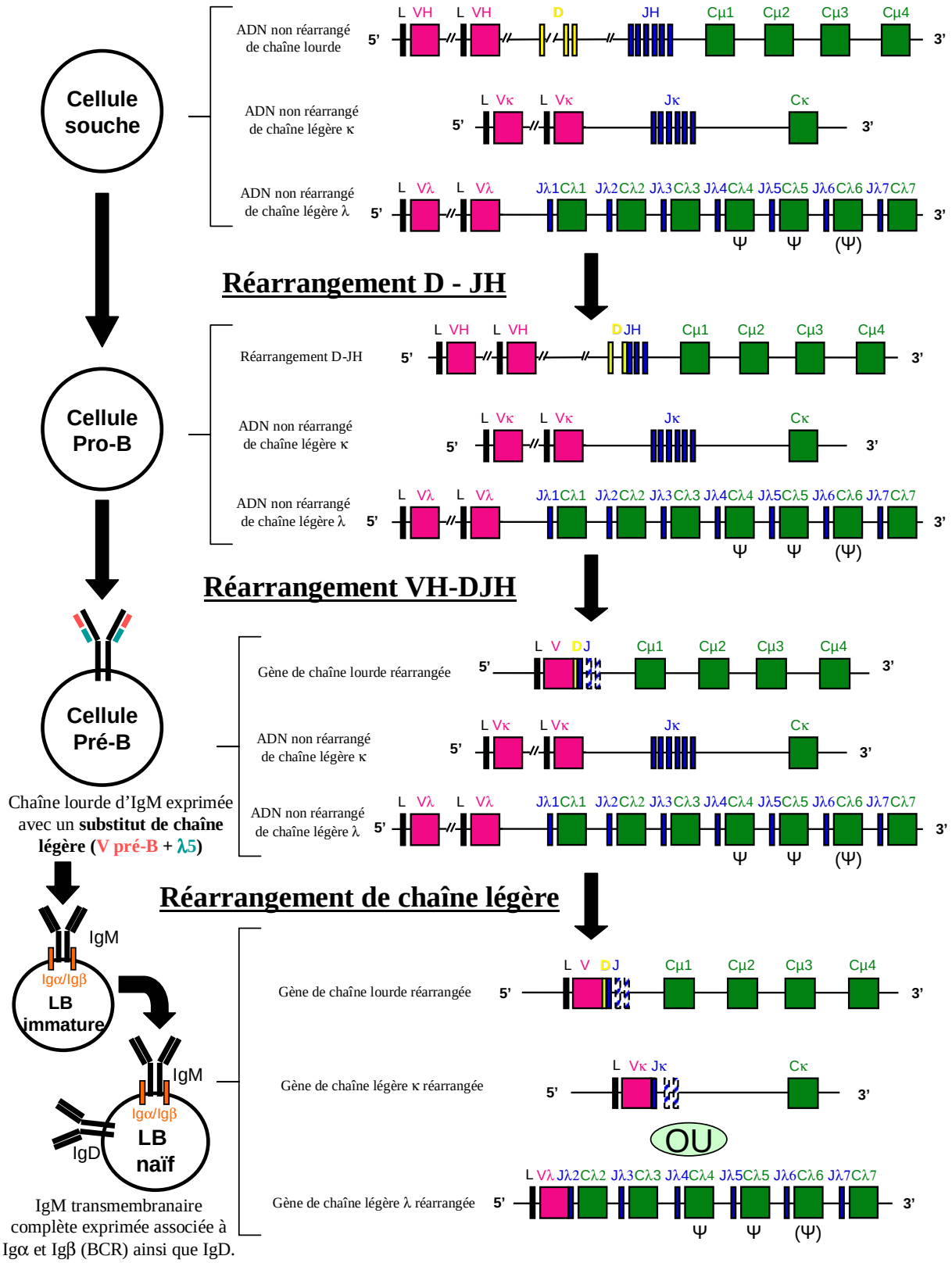


Figure 7. Chronologie de la recombinaison V(D)J. Sur la gauche, sont représentées les différentes étapes du développement d'un lymphocyte B. Ψ signifie que le gène est un pseudogène. Pour Cλ6, cela dépend de l'haplotype, mais le plus fréquemment, c'est un pseudogène.

La cellule qui exprime alors les chaînes légères est un lymphocyte B immature qui possède à sa surface des IgM, associées à des Igα et Igβ (autrement nommées respectivement CD79A et CD79B) servant à la transduction du signal. En effet, ces protéines ont de longs domaines cytoplasmiques qui interagissent avec les protéines de signalisation intracellulaire. L'ensemble constitue alors le récepteur des cellules B, appelé BCR (**fig. 8**). L'expression des IgD à la surface d'une cellule B suit cette expression du BCR et la cellule B est alors un lymphocyte B mature naïf (c'est-à-dire n'ayant pas eu de contact avec un antigène) exprimant à la fois les IgM et des IgD de surface (**fig. 7**). Cette cellule B fonctionnelle va alors quitter la moelle osseuse et coloniser un des organes lymphoïdes secondaires pour pouvoir reconnaître un éventuel antigène circulant dans l'organisme.

1.4.4. Mécanisme de recombinaison V(D)J

La « sélection » d'un segment V, d'un segment D et d'un segment J à recombiner n'est pas tout à fait le fruit du hasard. En fait, les histones des segments qui vont se recombiner subissent des modifications épigénétiques, telles que des méthylations (Su & Tarakhovsky, 2005) ou des acétylations (Johnson *et al.*, 2003 ; Espinoza & Feeney, 2005 ; Xu & Feeney, 2009). Ce sont ces modifications qui vont permettre la reconnaissance des segments à recombiner par la machinerie de recombinaison. Ces modifications apparaissent d'abord au niveau du locus de la chaîne lourde puis du locus de la chaîne κ et enfin celui de la chaîne λ (Johnson *et al.*, 2003 ; Xu & Feeney, 2009). Une fois les segments à recombiner rendus accessibles, il y a reconnaissance des signaux de jonction situés en 3' des segments V, en 5' et en 3' des segments D (pour la chaîne lourde) et en 5' des segments J. Ces signaux de jonction sont composés d'un heptamère de séquence consensus [CACAGTG] et d'un nonamère de séquence consensus [ACAAAAACC], séparés par 12 ou 23 nucléotides (**fig. 9A et 9B**). Les heptamères et nonamères en 3' des segments V sont complémentaires des heptamères et nonamères en 5' des segments J (chaînes légères) ou des segments D (chaînes lourdes), permettant la recombinaison. Pour la chaîne lourde, les heptamères et nonamères en 3' des segments D sont complémentaires des heptamères et nonamères en 5' des segments J. La recombinase RAG permet la formation d'une structure secondaire entre les segments V-D, D-J (chaîne lourde, **fig. 9A**) ou V-J (chaîne légère, **fig. 9B**) à recombiner, ce qui permet leur rapprochement. Il y a alors coupure double brin de l'ADN et jonction des deux extrémités formées. Ces jonctions peuvent contenir des délétions ou des insertions de quelques nucléotides.

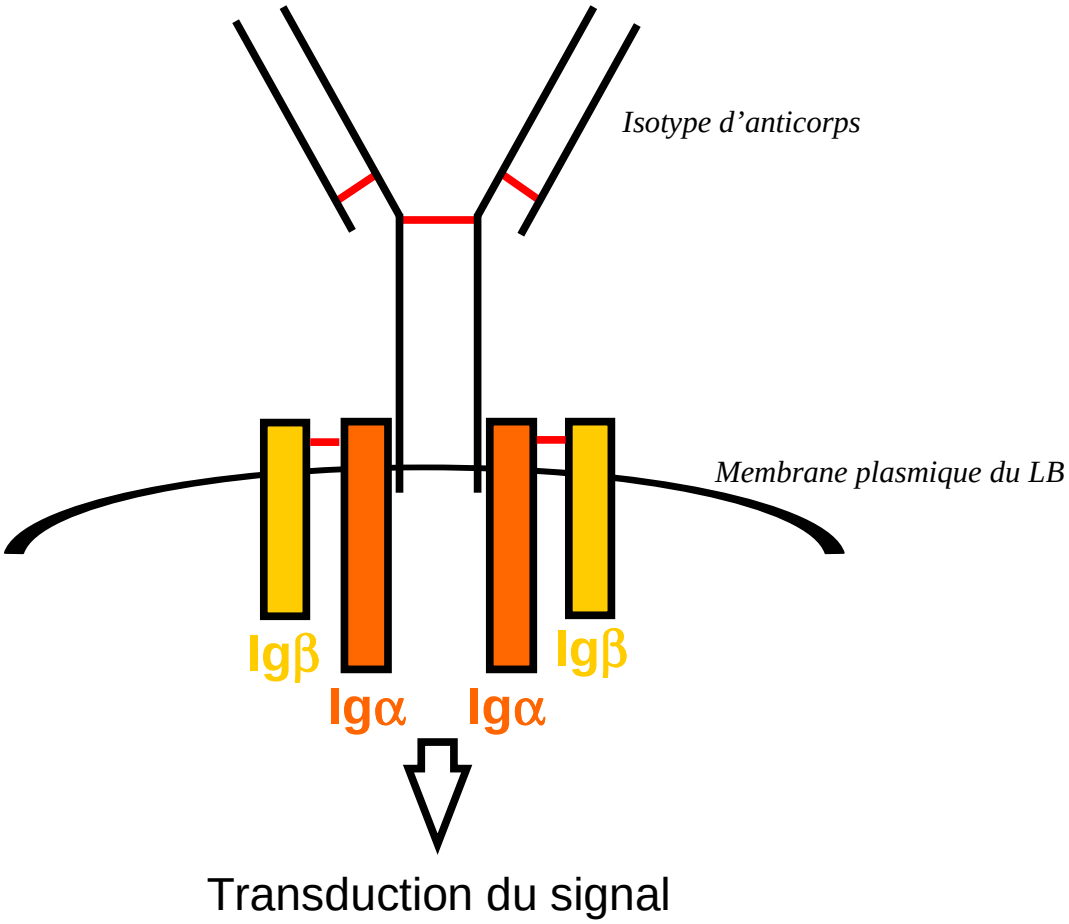


Figure 8. Schéma de la structure du BCR. L'isotype exprimé à la surface de la cellule B est associé à des Igα et Igβ, reliées entre elles par un pont disulfure extracellulaire (trait rouge), responsables de l'activation des protéines intracellulaires de la transduction du signal. Les immunoglobulines de n'importe quel isotype peuvent jouer le rôle de récepteur des cellules B (BCR).

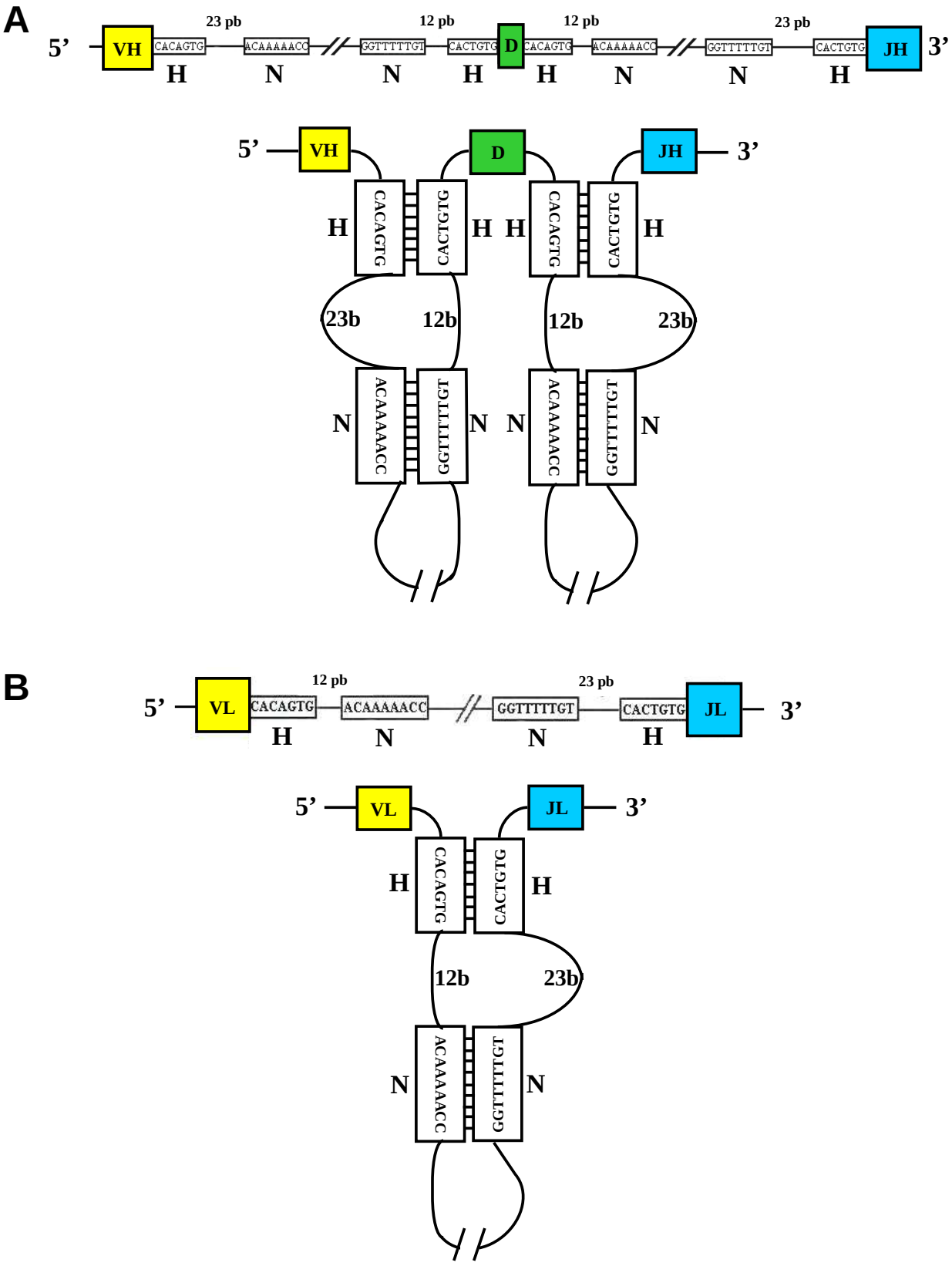


Figure 9. Représentation schématique des signaux de recombinaison présents au niveau des segments géniques des chaînes lourdes **(A)** et légères **(B)**. H: heptamère. N: nonamère. Les heptamères et les nonamères sont séparés par 12 ou 23 nucléotides (espaceurs). Pour qu’il y ait recombinaison, il faut l’association d’un signal avec un espaceur de 12 nucléotides et d’un signal avec un espaceur de 23 nucléotides.

Plusieurs protéines interviennent dans le processus de recombinaison V(D)J. Certaines sont des composants exclusivement lymphoïdes, comme l'IL7 (Corcoran *et al.*, 1996), RAG1, RAG2 (Schatz *et al.*, 1989 ; Oettinger *et al.*, 1990 ; Corneo *et al.*, 2001) ou Pax5 (Fuxa *et al.*, 2004) ; d'autres sont ubiquitaires, comme la DNAPKc (Blunt *et al.*, 1995), le dimère Ku70-Ku80 (Smider *et al.*, 1994 ; Taccioli *et al.*, 1994 ; Taccioli & Alt, 1995), Artemis (Moshous *et al.*, 2001), XRCC4 et la DNA LigaseIV (Li *et al.*, 1995 ; Grawunder *et al.*, 1998).

L'interleukine 7 joue un rôle essentiel dans le processus de recombinaison V(D)J. En effet, sa production par les cellules stromales de la moelle osseuse et sa fixation à son récepteur situé à la surface des cellules précurseurs lymphoïdes permet dans un premier temps la survie et la prolifération des cellules lymphoïdes (par la voie de signalisation intracellulaire Jak3/STAT5 (Nosaka *et al.*, 1995 ; Park *et al.*, 1995 ; Puel & Leonard, 2000) et également d'aboutir à la modification épigénétique des histones (acétylations, méthylations), rendant l'ADN accessible aux protéines RAG1 et RAG2 (Huang & Muegge, 2001 ; Chowdhury & Sen, 2004). Ces deux dernières s'associent pour constituer la recombinase (Mombaerts *et al.*, 1992 ; Shinkai *et al.*, 1992). Elles reconnaissent les signaux de jonction et s'y fixent pour favoriser la formation de structures secondaires entre 2 heptamères et 2 nonamères afin de les exciser par introduction de coupures double-brin dans l'ADN. Ces coupures sont réalisées entre les signaux de jonction et les segments V, D ou J codants. Deux types d'extrémités sont obtenues : des extrémités à bouts francs au niveau des signaux de jonction appariées et des extrémités en épingle à cheveux au niveau des segments V, D ou J codants. Après ce clivage, la recombinase reste associée à l'ADN codant (Fugmann *et al.*, 2000). Interviennent ensuite des protéines ubiquitaires associées à la réparation des cassures d'ADN : il y a tout d'abord la sous-unité catalytique de la DNA-PK (DNA-PKc) ainsi que le dimère Ku70-Ku80 qui se lient au niveau des extrémités d'ADN (Jeggo, 1998 ; Weterings & Chen, 2008). Il y a alors autophosphorylation de la DNA-PKc, changeant ainsi sa conformation. L'ADN sera alors accessible à la protéine Artemis, une endonucléase capable de cliver les épingles à cheveux des extrémités d'ADN codantes (Ma *et al.*, 2002 ; Goodarzi *et al.*, 2006). Des polymérases de la famille des Polymérases X (Pol X) vont alors intervenir. Ces polymérases sont la polymérase λ et la TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) s'il s'agit de l'ADN codant la chaîne lourde d'anticorps ou la DNA polymerase μ (Polμ) s'il s'agit de l'ADN codant une des chaînes légères. Bien que ces polymérases aient des structures très proches, leurs rôles sont distincts et elles ne peuvent pas se remplacer entre elles (Reynaud *et al.*, 2001 ; Bertocci *et al.*, 2006). En effet, la polymerase λ est recrutée lors du réarrangement des segments géniques de la chaîne lourde avant que la TdT n'agisse (Bertocci *et al.*, 2006).

Elle aurait pour fonction de maintenir une grande hétérogénéité de jonction entre les segments recombinés. Quant à la TdT, elle ajoute des nucléotides aux jonctions VH-D et D-JH (Gilfillan *et al.,* 1993 ; Komori *et al.,* 1993). Durant le processus de recombinaison, la Polμ intervient lors de la création des jonctions VL-JL, à un stade auquel la TdT n'est plus exprimée (Bertocci *et al.,* 2003). Une fois que ces polymérases ont terminé leur fonction, le complexe XRCC4-ligase IV relie les segments d'ADN codants (Gu *et al.,* 2007 ; **fig. 10**).

Il est à noter que Pax5, élément d'identité des lymphocytes B (Carotta & Nutt, 2008), ainsi que Ezh2 (Su *et al.,* 2003), YY-1 (Liu *et al.,* 2007) ou encore Ikaros (Reynaud *et al.,* 2008) sont requis pour favoriser le rapprochement physique des segments VH les plus lointains de l'ensemble [D-JH] déjà recombiné en agissant sur la chromatine et ainsi faciliter leur recombinaison. Ces éléments ne sont par contre pas nécessaires lorsque le segment VH à recombiner est proche de l'ensemble [D-JH] (Fuxa *et al.,* 2004).

1.4.5. Variabilité générée par la recombinaison V(D)J

La grande variabilité créée par le mécanisme de recombinaison V(D)J est donc due :

- au grand nombre de combinaisons possibles entre les segments VH-D-JH et VL-JL. Par exemple, chez l'homme, il existe environ 42 VH x 23 D x 6 JH = 6000 combinaisons de chaînes lourdes. Il faut multiplier ce nombre par celui des combinaisons VL-JL des chaînes κ (~180) ou λ (~130). Les combinaisons sont plus nombreuses pour κ que pour λ du fait d'un plus grand nombre de segments VL fonctionnels (~36 pour Vκ contre ~33 pour Vλ) et au fait que dans le locus λ, les segments J et C sont déjà associés et seuls 4 couples [Jλ-Cλ] sont fonctionnels (Jhunjhunwala *et al.,* 2009), contrairement à la chaîne κ (**fig. 6**).
- à l'imprécision de la coupure double brin de l'ADN. Ces coupures peuvent avoir lieu à la limite même des segments recombinés ou être décalés de 1 ou 2 nucléotides ce qui entraine un changement d'acide aminé au niveau du CDR3 ;
- par l'ajout de nucléotides au niveau des jonctions VH-D et D-JH par la polymérase λ puis la TdT et au niveau des jonctions VL-JL par la Polμ ;
- à l'ouverture des extrémités codantes qui ont des structures en épingle à cheveux. Cela peut générer des structures palindromiques au niveau des jonctions ;
- au fait que certains segments D peuvent être réarrangés en orientation inverse (3' vers 5'), être fusionnés à un autre segment D (D-D) et être traduit dans n'importe quel cadre de lecture ;

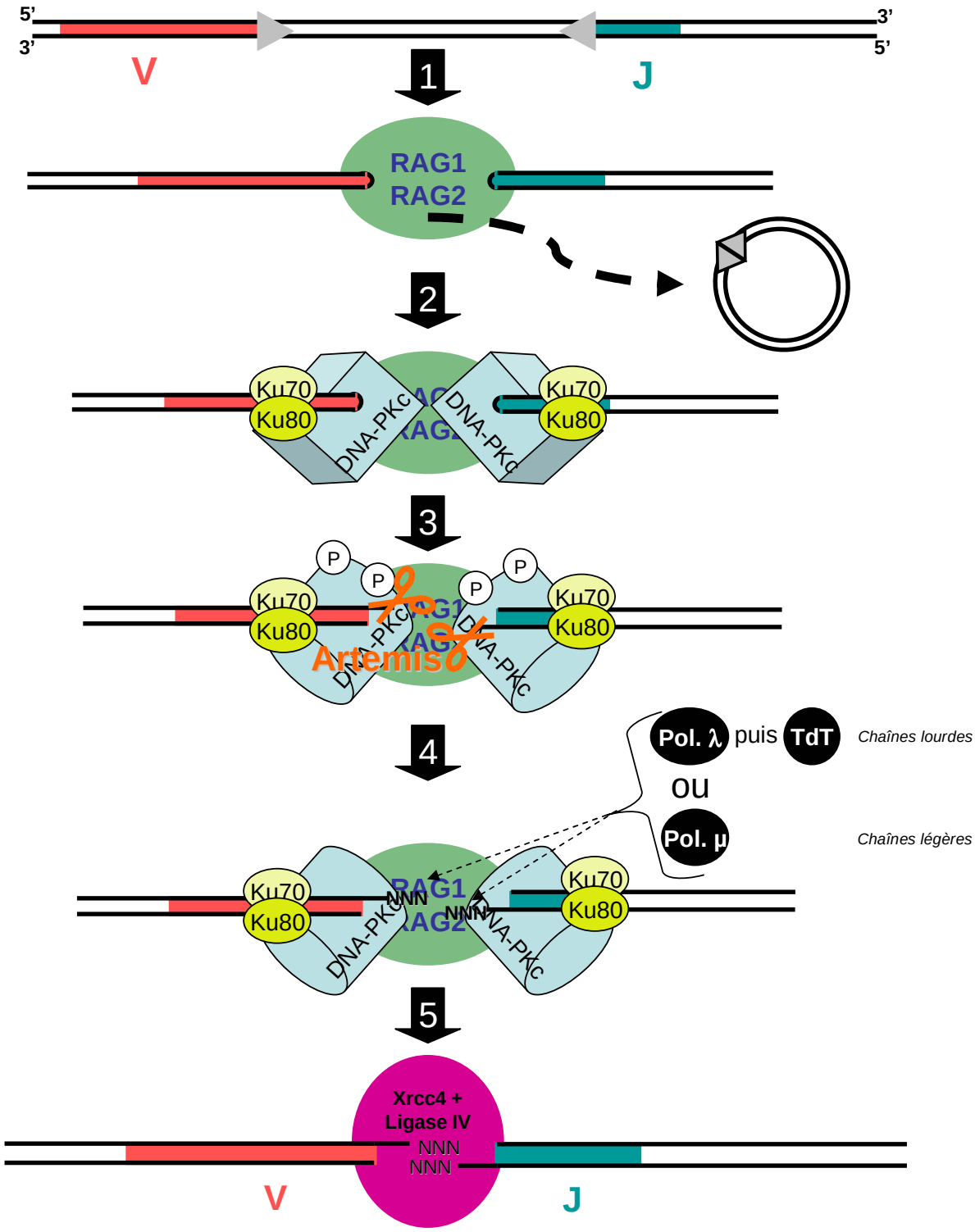


Figure 10. Représentation schématique des principales étapes de la recombinaison V(D)J. **1**) RAG1 et RAG2 s'attachent au signaux de recombinaison (triangles gris) et coupent l'ADN entre ces derniers et la région codante. Les extremités au niveau des signaux de recombinaison seront à bout franc alors qu'au niveau des segments codants, ce seront des épingles à cheveux. **2**) Le complexe s'enrichit de l'hétérodimère Ku70/Ku80 puis de la DNA-PKc. **3**) L'autophosphorylation de la DNA-PKc provoque un changement de conformation de la protéine ce qui permet à Artemis de cliver les épingles à cheveux. **4**) Des polymérases de la famille polX vont ajouter aléatoirement des nucléotides dans le sens 5'→3'.
5) Le complexe XRCC4-DNA ligase IV va joindre les segments d'ADN codants.

- enfin, aux mutations somatiques ponctuelles survenant dans les régions hypervariables (CDR). Ces mutations permettent d'augmenter l'affinité de l'anticorps pour un antigène donné et rendent ainsi plus efficace la réponse humorale (voir 1.4.6. ci-dessous).

A l'issue des réarrangements géniques aboutissant à l'expression du BCR à la surface des lymphocytes B, celui-ci va quitter la moelle osseuse et coloniser un des organes lymphoïdes secondaires afin de rencontrer éventuellement « son » antigène. Les anticorps vont alors subir des mutations somatiques et la commutation de classe qui vont respectivement augmenter l'affinité de l'anticorps et l'isotype.

1.4.6. Les mutations somatiques

Les mutations somatiques, encore appelées hypermutations, affectent spécifiquement les sites d'ADN codant les régions hypervariables (CDR) des chaînes lourdes et légères des anticorps. Ces mutations ont pour but d'augmenter l'affinité de l'anticorps pour l'antigène. (Steele, 2009). Lorsque les lymphocytes B rencontrent pour la première fois « leur » antigène dans les organes lymphoïdes secondaires, ils se multiplient sous l'action de cytokines produites par des lymphocytes T auxiliaires activés par la présence de l'antigène. Si le BCR possède une forte affinité pour l'antigène, alors la cellule va directement se différencier en plasmocyte et sécréter des anticorps ou bien se différencier en LB mémoire. Par contre, si le LB a une affinité faible, il va former un centre germinatif (Berek *et al.*, 1991 ; Paus *et al.*, 2006) dans lequel il devient un centroblaste qui prolifère intensément (**fig. 11A**). Au cours des divisions cellulaires, des mutations ponctuelles vont être introduites spécifiquement dans les CDR des segments VH et VL réarrangés. Une fois mutés, les gènes de la chaîne lourde et de la chaîne légère s'expriment à la surface de la cellule (BCR) qui est ainsi devenue un centrocyte. Ceux qui ont une affinité forte pour l'antigène présenté à la surface des cellules dendritiques folliculaires contenues au sein du centre germinatif (**fig. 11B**) seront sélectionnés (environ 5%) et peuvent se différencier en plasmocyte sécréteur d'anticorps ou en cellule mémoire. Les autres centrocytes (environ 95%) sont éliminés par apoptose.

Les mutations somatiques sont des mutations ponctuelles aboutissant dans la plupart des cas à une modification de l'acide aminé codé. Ces mutations sont beaucoup plus fréquentes que les mutations spontanées, la machinerie responsable de ces mutations doit donc être très fortement régulée. Les points chauds de ces mutations sont les motifs [RGYW] (où R=A/G, Y=C/T, W=A/T), nombreux dans les CDR. Il a été montré le rôle primordial de la protéine AID (Activation-Induced cytidine Deaminase) dans le processus des mutations

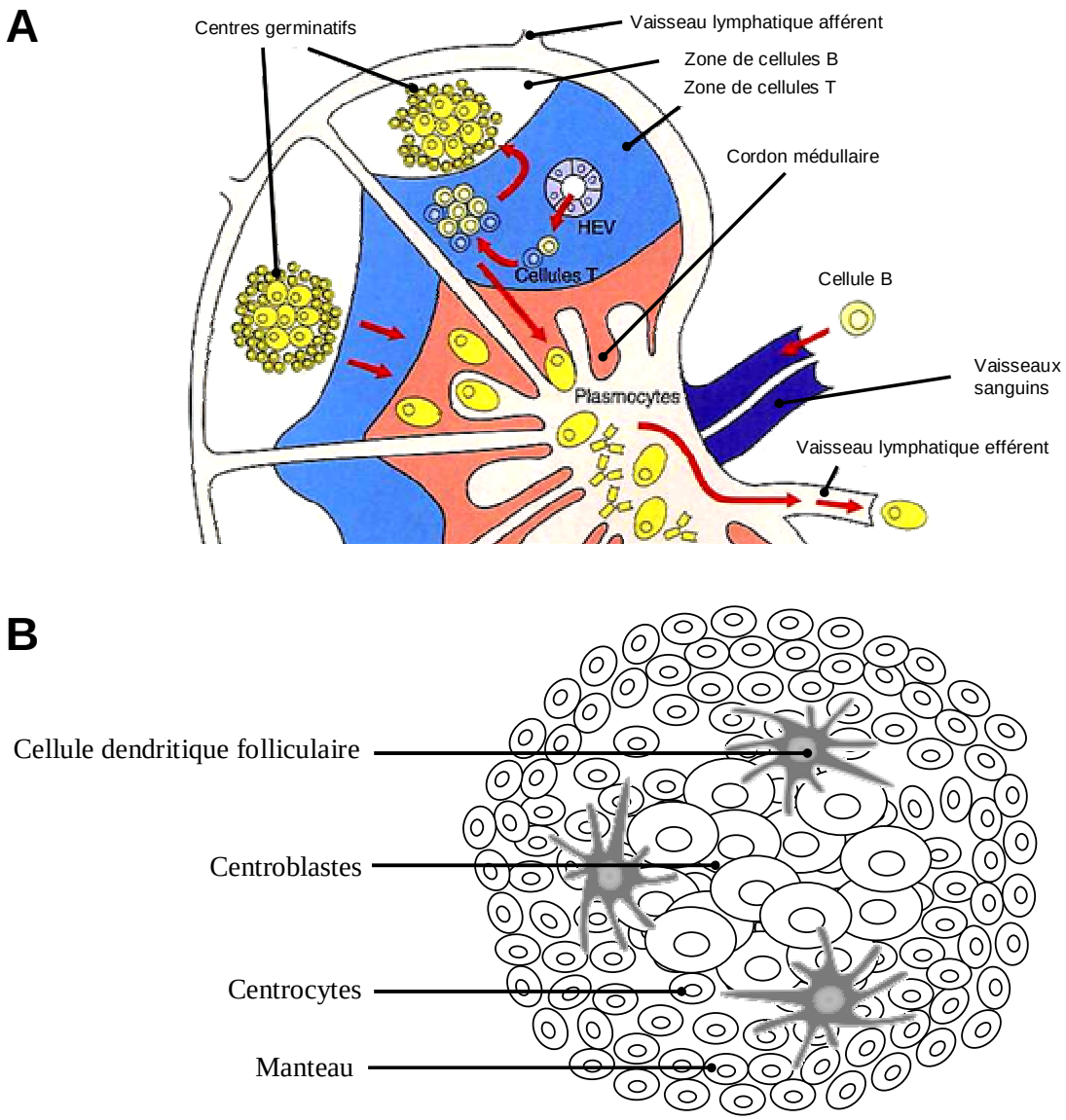


Figure 11. (A) Schéma de l'activation des lymphocytes B dans une coupe transversale de ganglion lymphatique. Le lymphocyte B mature entre dans la zone des cellules T en traversant la paroi des veinules postcapillaires dites HEV (High Endothelial Veinule). L'antigène est fourni par les vaisseaux lymphatiques afférents qui drainent la lymphe des tissus. Le lymphocyte B rencontre l'antigène et est activé par les lymphocytes T helper. La cellule B entre alors en division et forme un foyer primaire. Si l'anticorps à la surface du lymphocyte B a une affinité suffisante, la cellule migre vers les cordons médullaires où elle se différencie en plasmocyte sécréteur d'anticorps. Si l'affinité est moins forte, le lymphocyte B entre dans la zone des cellules B et forme un centre germinatif pour augmenter l'affinité des anticorps envers l'antigène grâce aux mutations somatiques.

(B) Représentation schématique d'un centre germinatif. Les centroblastes sont des cellules B en division et activées par l'Ag. Les centrocytes sont des cellules B qui ont subit les hypermutations. Elles interagissent avec les cellules dendritiques folliculaires présentant l'antigène pour vérifier leur affinité avec ce dernier. Les cellules dendritiques sont moins nombreuses mais leurs prolongements cellulaires forment un réseau étendu dans tous le centre. Le manteau contient également des lymphocytes T helper qui ont activé les lymphocytes B.

somatiques. Cette protéine est une enzyme exprimée exclusivement dans les LB des centres germinatifs (Muramatsu *et al.*, 1999). C'est une cytidine déaminase capable de désaminer les cytidines (C) en uracile (U) au niveau de l'ADN en cours de transcription (Shen *et al.*, 2009). Mais étant donné que les hypermutations n'affectent pas uniquement les cytosines, d'autres protéines sont impliquées dans ce processus de mutation, comme par exemple l'uracile glycosylase (UNG), MSH2 (Rada *et al.*, 2004), l'exonucléase 1 (Bardwell *et al.*, 2004) ou encore la polymérase η (Steele, 2009). Ces protéines seraient responsables des mutations au niveau des paires A:T. Rev1, une autre polymérase, serait, quant à elle, impliquée dans les mutations sur les paires C:G (Jansen *et al.*, 2006). Les deux dernières polymérases citées ci-dessus nécessitent un cofacteur, la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), dont l'absence diminue la fréquence des hypermutations (Arakawa *et al.*, 2006).

1.4.7. La commutation de classe

Tout comme les mutations somatiques, la commutation de classe va avoir lieu dans les centres germinatifs. Ce phénomène va permettre la recombinaison au sein des segments constants (C) des chaînes lourdes afin d'obtenir la synthèse d'une immunoglobuline différente d'une IgM ou d'une IgD (chez les mammifères, on pourra ainsi obtenir la synthèse d'une IgG, d'une IgA ou d'une IgE). Ce processus permet donc un changement d'isotype d'anticorps. Les différents isotypes ont des fonctions différentes (voir § 1.4.2). Ce changement de classe se réalise lors d'une rencontre secondaire entre un LB et son antigène.

La commutation de classe est effectuée par une machinerie de recombinaison appelé « class-swith recombination » (CSR). Les différents segments C au niveau de l'ADN sont précédés par des régions « switch » (S), sauf entre Cμ et Cδ, expliquant de ce fait leur expression simultanée à la surface d'un LB naïf (**fig. 12A**). Ces séquences sont composées de motifs répétés en tandem (20 à 80 nucléotides sur 1 à 12 kb). Par exemple, la séquence S en amont du segment Cμ contient une répétition en tandem d'environ 150 fois la séquence consensus $[(GAGCT)_3GGGGT]$ formant un motif d'environ 3 kb. Chaque séquence switch possède sa propre séquence consensus mais toutes possèdent les motifs [GGGGT] et [GAGCT] (Stavnezer & Amemiya, 2004 ; Selsing, 2006). Ce dernier motif est une séquence [RGYW] (présente dans les CDR des segments V et considérée comme point chaud pour les mutations somatiques). Il est aisé de faire ainsi le lien entre la présence de ces motifs et l'implication d'AID dans le processus de commutation de classe. En effet, cette protéine, exprimée exclusivement dans les centres germinatifs et impliquée dans les hypermutations, a été retrouvée impliquée dans le processus de commutation de classe (Okazaki *et al.*, 2002).

Bien que ces motifs soient nécessaires pour une commutation de classe efficace, la longueur de la séquence switch est importante. En effet, l'absence de motif diminue la commutation mais en l'absence totale de séquence switch, cette diminution est plus prononcée (Khamlichi *et al.*, 2004). De plus, la longueur des séquences S est en corrélation avec le pourcentage de commutation (Zarrin *et al.*, 2005). La machinerie de recombinaison CSR induit la formation d'une structure secondaire, au niveau de l'ADN en cours de transcription, entre 2 séquences S. S'en suit une cassure double brin de l'ADN (Chaudhuri *et al.*, 2007 ; Yan *et al.*, 2007) pour éliminer la structure secondaire (**fig. 12B**) contenant les segments C non souhaités. La traduction permettra l'obtention de la chaîne lourde de l'isotype codé par le premier segment C suivant les segments VH-D-JH associés. Par exemple, si le switch n'a éliminé que les segments Cμ et Cδ, le premier segment C suivant est Cγ3 donc l'isotype sera une IgG3. Il peut y avoir accumulation de commutations de classe au fur et à mesure des rencontres avec l'antigène mais l'ADN éliminé lors du processus de recombinaison est définitivement perdu pour la cellule. Cela signifie dans l'exemple cité ci-dessus qu'il ne pourra plus jamais y avoir la synthèse d'IgM ni d'IgD. Par contre, une nouvelle commutation pourra par exemple permettre l'élimination des segments Cγ3 à Cε pour aboutir à la synthèse d'une IgA. Dans ce cas, plus aucune commutation ne sera possible lors de contacts ultérieurs de la cellule avec l'antigène. Cet isotype sera le dernier isotype synthétisable par ce lymphocyte B.

Tout comme dans la « sélection » des segments V, D et J à recombiner, il existe des modifications épigénétiques au niveau des histones de l'ADN des séquences S. De plus, les boucles formées entre l'ARN en cours de transcription et le brin codant au niveau des séquences S (appelées boucles R) seraient des signaux pour la machinerie de commutation (Selsing, 2006). Les modifications épigénétiques et la machinerie de recombinaison sont influencées par les cytokines produites par les LT auxiliaires. En effet, ce sont les cytokines présentes dans l'environnement du lymphocyte B, au sein du centre germinatif, qui vont induire la commutation de classe (Manis *et al.*, 2002). Les cytokines sont secrétées par les lymphocytes T auxiliaires activés suite à la reconnaissance de l'antigène. Les principales cytokines induisant la synthèse d'anticorps (« Th2 » c'est-à-dire activant le système immunitaire adaptatif à médiation humorale) et influençant la commutation de classe sont l'IL4, l'IL5 et le TGFβ. L'IL4, par exemple, est connue pour favoriser la commutation vers le segment Cγ1 ou Cε, permettant l'expression d'IgG1 ou d'IgE, respectivement. Le TGFβ favorise l'expression du segment Cγ2 ou Cα et donc des IgG2 ou des IgA. Une cytokine « Th1 », l'IFNγ, impliquée dans l'activation du système immunitaire adaptatif à

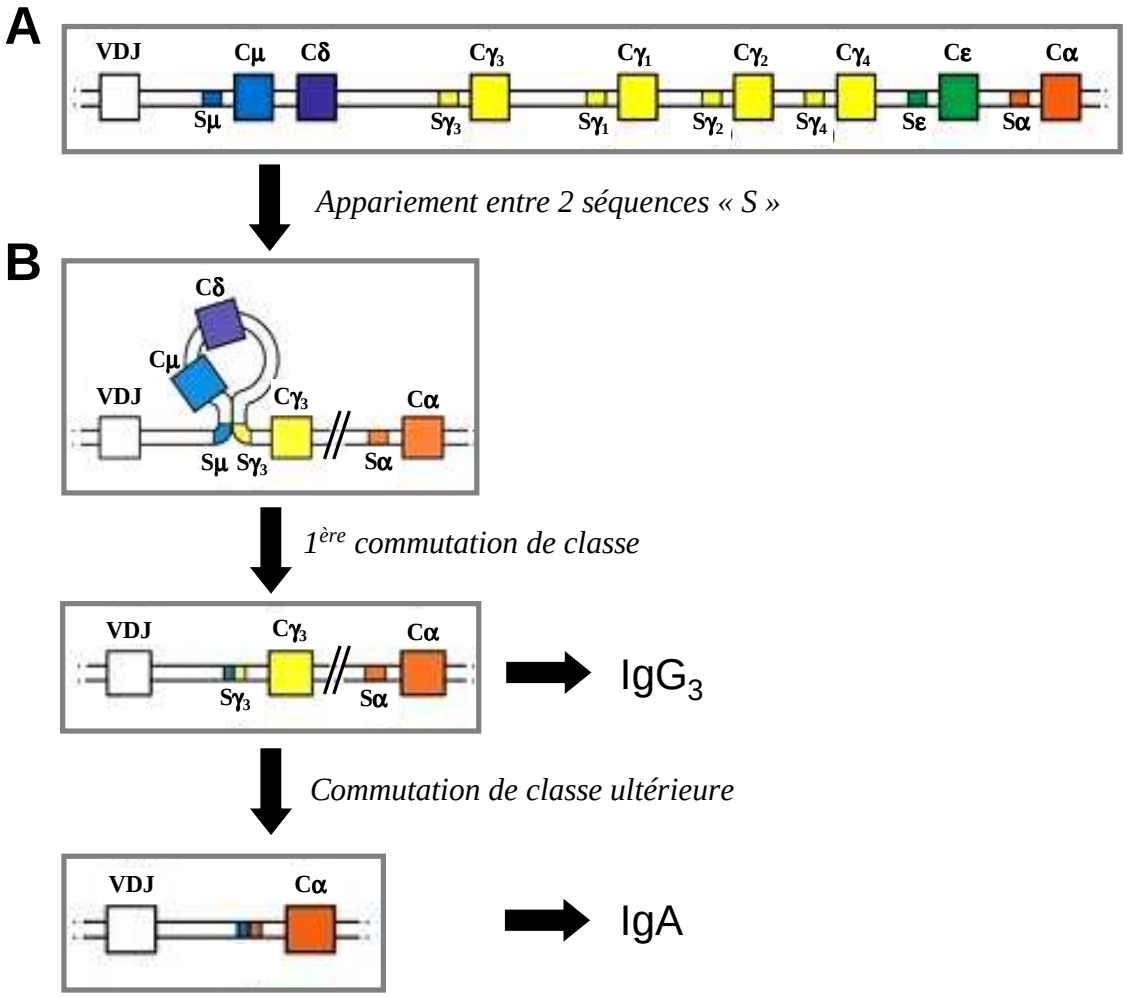


Figure 12. (A) Schéma d'organisation des segments constants de la chaîne lourde sur l'ADN murin. Chaque segment constant (C) est précédé en 5' par une séquence « Switch » (S), nécessaire à la commutation de classe, sauf en 5' du segment Cδ. Ainsi, les IgM et les IgD s'expriment simultanément, par épissage alternatif.
(B) La recombinaison entre 2 séquences S permet la formation d'une boucle d'ADN qui sera excisée et éliminée définitivement de la cellule. Sur cet exemple, c'est une IgG3 qui sera exprimé suite à un premier évènement de commutation de classe. Une commutation ultérieure permettra, par exemple, d'exprimer une IgA.
Pour plus de clarté, les exons de chaque segment C ne sont pas détaillés.

médiation cellulaire, est également capable d'influencer la commutation de classe. Cette cytokine favorise ainsi l'expression des IgG2 ou IgG3 (**tableau 1**).

En plus des cytokines synthétisées par les lymphocytes T auxiliaires activés, l'interaction entre le ligand de CD40 (à la surface des LT auxiliaires) et son récepteur (présent à la surface des LB) est essentielle dans le processus de commutation de classe. Ainsi, l'interaction LT-LB est indispensable. En effet, sans cette interaction, seuls des IgM sont sécrétés et aucune commutation de classe n'est possible. C'est ce qui est responsable du syndrome d'hyper IgM chez les patients dont le gène codant le ligand CD40 est non fonctionnel. Ces patients n'expriment pas d'IgG, d'IgA et d'IgE (Ramesh *et al.*, 1995).

1.4.8. Formes transmembranaires et sécrétées des anticorps

Un anticorps peut être ancré à la membrane du lymphocyte B ou bien sécrété par la cellule. C'est au niveau du segment constant (C) de la chaîne lourde que sera déterminé si l'anticorps sera membranaire ou sécrété. Dans sa forme membranaire, l'anticorps possède un domaine transmembranaire hydrophobe qui l'ancre dans la membrane du lymphocyte B. Ce domaine est absent dans la forme sécrétée de l'anticorps. La forme transmembranaire est monomérique et ce, quel que soit l'isotype. En revanche, la forme sécrétée peut être monomérique (IgG, IgE), dimérique (IgA des muqueuses) ou encore pentamérique (IgM). Il faut noter que les IgD sont presque exclusivement membranaires. Les extrémités carboxy-terminales des formes transmembranaires des chaînes lourdes sont codées par des exons séparés (exons M1 et M2, **fig. 13**). Deux sites de polyadénylation existent à l'extremité 3' de chaque segment C. C'est le choix du site de polyadénylation qui determine si l'anticorps sera membranaire ou sécrété. Chaque gène de chaîne lourde possède donc deux sites potentiels de terminaison de la transcription. Si celle-ci s'arrête au premier site, il n'y aura pas transcription de la portion codant les exons transmembranaires, ce qui donnera la forme sécrétée de l'anticorps. En revanche, si la transcription s'arrête au second site de terminaison, les deux exons transmembranaires (M1 et M2) seront transcrits et traduits, aboutissant à la forme membranaire de l'anticorps. Dans ce cas, un épissage de l'ARNm (au niveau d'un site d'épissage interne situé entre CH4 et CH-S) permettra d'ôter la séquence CH-S, présente à l'extremité C-terminale de la forme sécrétée (**fig. 13**).

	Influence des cytokines sur la commutation de classe (chez la souris)						
	IgM	IgG3	IgG1	IgG2b	IgG2a	IgA	IgE
IL4	Inhibe	Inhibe	Induit		Inhibe		Induit
IL5						↑ prod.	
IFNγ	Inhibe	Induit	Inhibe		Induit		Inhibe
TGFβ	Inhibe	Inhibe		Induit		Induit	

Tableau 1. Exemples de cytokines induisant la commutation de classe dans les cellules B de souris. Certaines cytokines peuvent induire (en vert) ou inhiber (en rouge) la commutation de classe vers un isotype particulier.

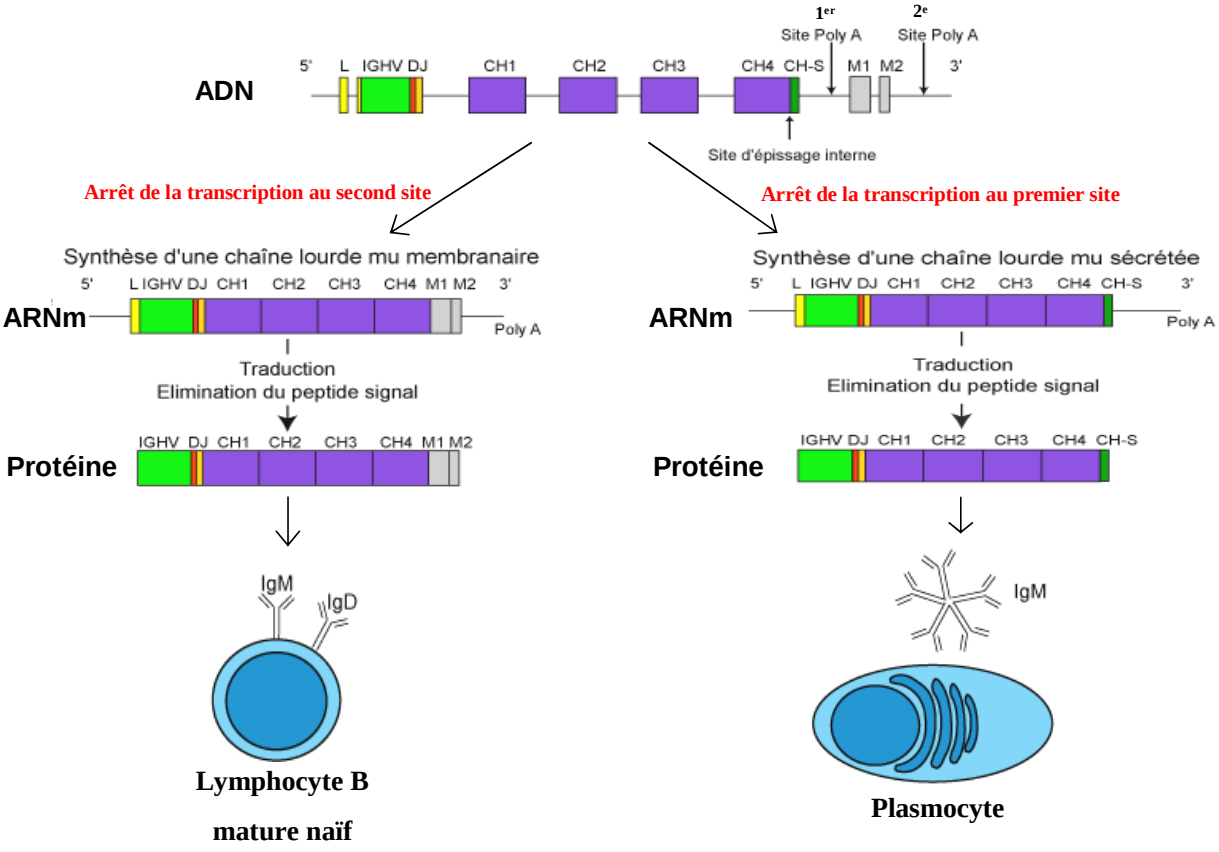


Figure 13. Synthèse des formes membranaires et sécrétées d'un anticorps (IgM dans cet exemple). C'est le choix du site de polyadénylation qui détermine si l'anticorps sera membranaire ou sécrété membranaire ou sécrétée. La forme membranaire possède 2 exons (M1 et M2) codant la partie transmembranaire de la chaîne lourde. Figure adaptée de Lefranc, 2009.

1.5. Phylogénie de la réponse humorale

1.5.1. Apparition de la réponse immunitaire adaptative

L'immunité adaptative semble être apparue il y a environ 500 millions d'années lors de la séparation des vertébrés à mâchoires de ceux sans mâchoire. Chez les agnathes (lamproie, myxine), la réponse immunitaire est médiée par des récepteurs variables appelés VLR (Variable Lymphocyte Receptor), qui sont des monomères (**fig. 14**). Ces VLR possèdent une partie variable et une partie constante. Il en existe 2 groupes : les VLRA et les VLRB. Le mécanisme de fabrication des VLRA semble être dépendant de CDA1, une cytidine déaminase (Guo *et al.*, 2009). Les VLRB sont codés par un gène organisé en segments géniques variables riches en leucine (LRR) et sont soumis à un mécanisme de recombinaison induit par CDA2, une autre cytidine déaminase. Les cellules exprimant VLRA répondent plutôt à des mitogènes spécifiques des LT comme la PHA (phytohémagglutinine) ce qui suppose donc que ces cellules $VLRA^+$ sont équivalents aux LT. Les cellules $VLRB^+$ seraient, quant à elles, équivalentes aux LB puisqu'une réponse immunitaire permet à ces cellules d'être morphologiquement semblables à des plasmocytes (Guo *et al.*, 2009).

1.5.2. Isotypes d'anticorps chez les vertébrés

Chez les vertébrés à mâchoire, le nombre d'isotypes d'anticorps varie entre les différentes classes du règne animal. On a longtemps pensé que le nombre d'isotypes et le degré d'évolution étaient étroitement liés. Cependant, depuis quelques années, de nouveaux isotypes ont été découverts chez les poissons et les amphibiens contredisant cette idée (**fig. 15**).

Ainsi, trois isotypes ont été découverts chez les poissons cartilagineux (IgM, IgNAR et IgW ; Flajnik, 2002) tout comme chez les oiseaux (IgM, IgY et IgA). IgNAR et IgW sont spécifiques aux poissons cartilagineux et sont composés de chaînes lourdes à 6 domaines constants. IgNAR est composé uniquement de chaînes lourdes (Roux *et al.*, 1998).

Cinq isotypes (IgM, IgD, IgH, IgT et IgZ) ont été décrits chez les poissons osseux (Danilova *et al.*, 2005 ; Hansen *et al.*, 2005 ; Savan *et al.*, 2005) et chez les amphibiens anoures (IgM, IgD, IgY, IgX et IgF). Les IgZ (spécifiques du poisson-zèbre) sont exprimées dans les tissus lymphoïdes primaires de l'animal alors que les IgT (spécifiques de la truite) sont exprimées dans de nombreux tissus. Avec les IgH (spécifiques du fugu), ces 3 derniers isotypes sont spécifiques d'espèces et ne sont pas homologues. En ce qui concerne les IgX et les IgY des anoures, ce sont respectivement les équivalents des IgA et des IgG des mammifères. Chez les amphibiens urodèles comme l'axolotl mexicain, les IgY sont

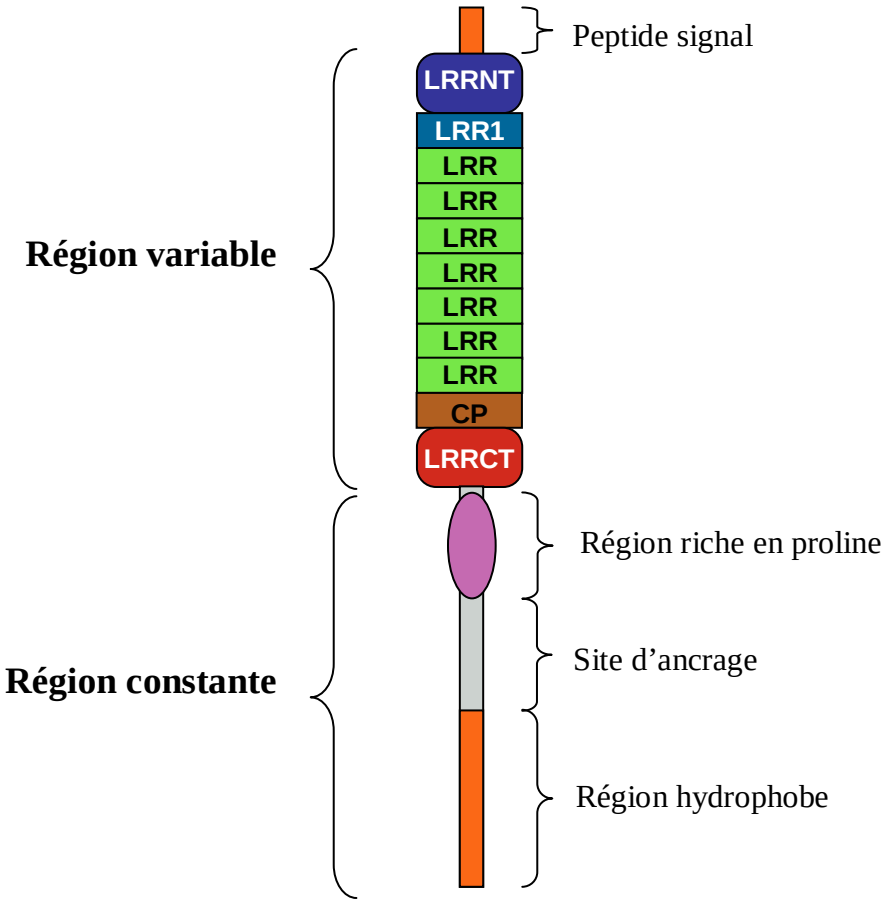


Figure 14. Représentation schématique d'un VLR. Un peptide signal précède la région variable. Tous les segments riches en leucine (LRR) sont des séquences variables. La région variable contient toujours un segment LRR N-terminal (LRRNT), un nombre variable de LRR, un peptide de connexion (CP) et un segment LRR C-terminal (LRRCT). La région constante est hautement conservée et contient une région riche en proline/thréonine, un site glycosyl-phosphatidyl-inositol d'ancrage à la membrane et une région hydrophobe transmembranaire.

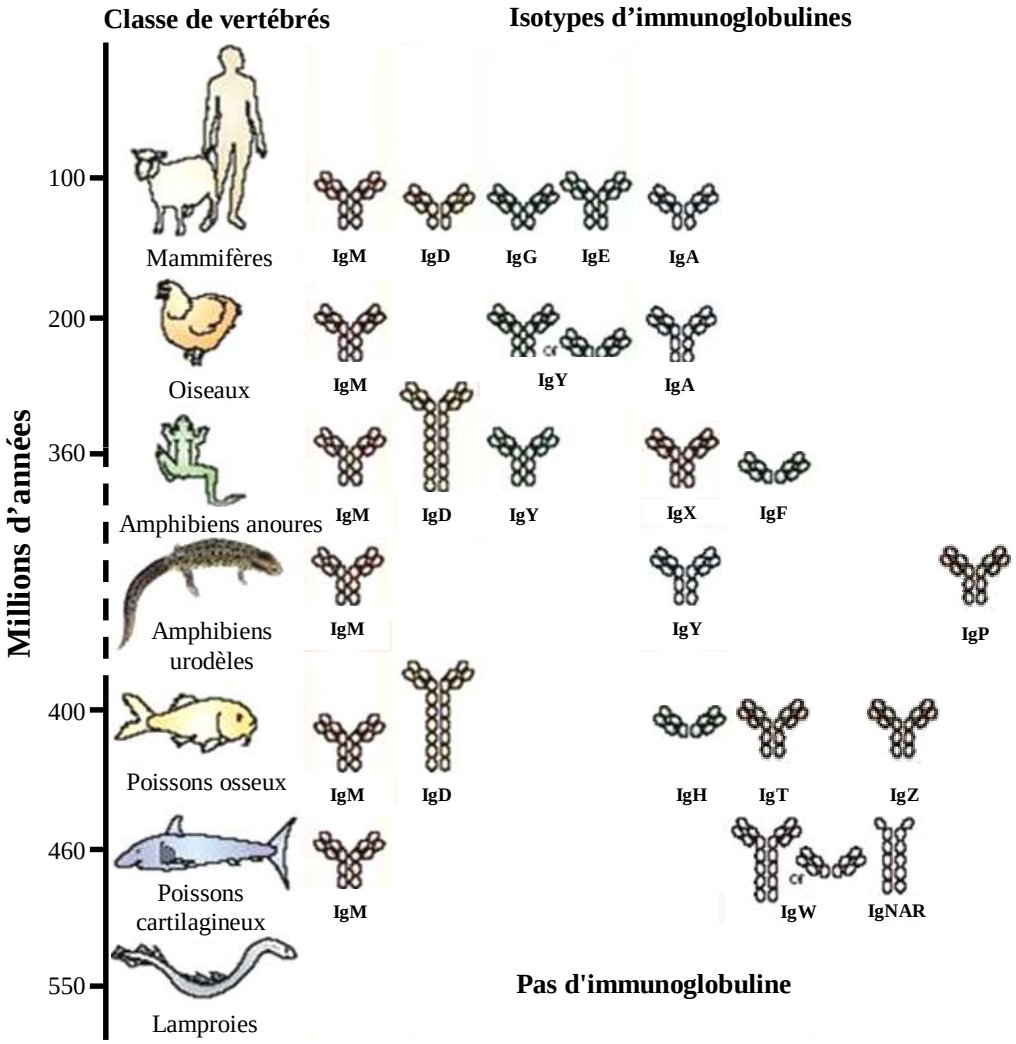


Figure 15. Les différents isotypes d'immunoglobulines identifiés chez les vertébrés. Chaque « colonne » représente des isotypes différents. Les isotypes d'une même colonne ont des fonctions similaires. Contrairement aux anoures, les IgY des urodèles sont l'équivalent des IgA de mammifères (Adapté de Flajnik, 2002).

l'équivalent des IgX des anoures ou des IgA des mammifères et des oiseaux. Chez le pleurodèle, autre amphibien urodèle, un autre isotype spécifique de l'espèce (IgP) a récemment été découvert (Schaerlinger *et al.*, 2008).

Les différentes classes de vertébrés à mâchoire possèdent donc plusieurs isotypes d'anticorps qui ont des fonctions distinctes. Certains sont des équivalents d'isotypes de mammifères. Ainsi, les IgM et les IgD sont très conservés au cours de l'évolution. Des isotypes associés aux muqueuses (IgA, IgX, IgY ou IgH) sont retrouvés également chez toutes les espèces. Des isotypes spécifiques d'espèces ont également été décrits (IgNAR et IgW chez les poissons cartilagineux ; IgZ et IgT chez les poissons osseux ; IgF chez les amphibiens anoures et IgP chez les amphibiens urodèles).

1.5.3. La recombinaison V(D)J dans les différentes classes de vertébrés

La recombinaison V(D)J se déroule chez toutes les espèces fabricant des anticorps, c'est-à-dire l'ensemble des vertébrés à mâchoire. Les facteurs clés de ce processus (protéines RAG ou encore la TdT) ont été identifiés dans chaque classe de vertébrés à mâchoires.

Chez les mammifères, toutes les espèces n'effectuent pas la recombinaison V(D)J tout au long de leur vie comme peuvent le faire l'homme ou la souris dans leur moelle osseuse (Flajnik, 2002). En effet, chez le lapin par exemple, la recombinaison ne s'effectue que du 12^{e} jour de gestation jusqu'à l'âge de 3-4 mois (Mage *et al.*, 2006).

Chez les oiseaux, la recombinaison V(D)J ne s'effectue que dans la bourse de Fabricius qui est présente uniquement au début de la vie de l'animal et qui régresse ensuite. Ces animaux vont plutôt utiliser les mutations somatiques et la conversion génique (transposition de segments géniques, provenant le plus souvent de pseudogènes, dans une région codante) pour faire varier leur répertoire d'anticorps (Flajnik, 2002).

Chez le xénope (amphibien anoure), la recombinaison V(D)J a lieu durant toute la vie de l'animal mais des changements apparaissent au cours de celle-ci. Au stade larvaire, les CDR3 sont courts car la TdT n'est pas encore exprimée, il n'y a donc pas d'ajouts de nucléotides (Lee & Hsu 1994 ; Du Pasquier *et al.*, 2000), contrairement aux stades ultérieurs de la vie de l'animal.

Les amphibiens urodèles, comme l'axolotl, présentent peu de segments de diversité (D) et également une faible fréquence d'ajout de nucléotides, aboutissant à une faible variabilité du CDR3 des chaînes lourdes. De plus, chez le pleurodèle, RAG1 ne s'exprime presque plus à l'âge de 2 ans ce qui laisse supposer que le recombinaison V(D)J disparaît avec l'âge chez cet animal (Frippiat *et al.*, 2001). Ainsi, chez les amphibiens urodèles, la

diversité du répertoire d'anticorps se déroulerait uniquement durant les premiers mois de leur existence.

Chez les poissons cartilagineux, RAG1 est exprimée tout au long de la vie de l'animal (Miracle *et al.*, 2001). La faible variabilité des anticorps observée chez ces animaux (Mäkelä & Litman, 1980) est due au fait que les segments VH sont très homologues entre eux, y compris dans les régions hypervariables CDR1 et CDR2. Les régions CDR3 sont les seules régions variables car ils peuvent contenir plusieurs segments D (Harding *et al.*, 1990 ; Rumfelt *et al.*, 2004).

1.5.4. Evolution des hypermutations somtiques et de la commutation de classe

Parmi les vertébrés capables de produire des anticorps, les poissons présentent une affinité faible de leur anticorps pour l'antigène. Cette faible affinité est très probablement due au fait que, chez ces animaux, il n'y a pas de centres germinatifs (Flajnik, 2002). L'absence de cette structure histologique suggère l'absence de sélection des mutations somatiques (augmentant l'affinité des anticorps) ou de commutation de classe (permettant d'adapter l'isotype pour faciliter l'élimination de l'antigène). Ceci nous montre donc que la capacité d'augmenter l'affinité des anticorps suite à une stimulation antigénique est apparue plus tard dans l'évolution des espèces.

Les mutations somatiques existent chez les poissons. Par exemple, chez le requin, le profil des mutations somatiques est comparable à celui des mammifères, au niveau des IgNAR (Diaz *et al.*, 1998 ; 1999). Par contre, pour les IgM de cette espèce, le profil des mutations est plus proche de celui du xénope (Wilson *et al.*, 1992 ; 1995), qui présente 4 à 7 fois moins de mutations que les mammifères. De plus, ces mutations touchent principalement les bases G:C plutôt que les bases A:T, suggérant un mécanisme d'hypermutations au moins partiellement différent de celui des mammifères. Enfin, nous avons étudié récemment le profil des mutations somatiques chez l'amphibien *P. waltl* dans le domaine V de la chaîne lourde des IgM de l'animal. Le profil est très semblable à celui du xénope, la plupart des hypermutations sont effectuées sur les bases G :C (**figure 4 de la publication 3**).

Chez les poissons, il n'y a pas de commutation de classe. Cette absence peut être expliquée par le fait que les chaînes lourdes des différents isotypes sont codées par des loci génétiques distincts. Pourtant, la protéine AID, facteur majeur dans ce processus, est exprimée de manière tout à fait fonctionnelle, malgré l'absence de centre germinatifs (Saunders & Magor, 2004 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Marr *et al.*, 2007). Chez ces espèces, cette

protéine est induite par une stimulation antigénique et est alors exprimée dans les organes lymphoïdes secondaires, au niveau des muqueuses ou des sites infectés (Marr *et al.*, 2007). Chez les amphibiens anoures, on observe la capacité de changer l'isotype d'anticorps suite à une immunisation. Ce sont les espèces les plus primitives qui possèdent les séquences « switch », essentielles dans le processus de commutation de classe (Du Pasquier *et al.*, 2000).

2. STRESS ET SYSTEME IMMUNITAIRE

2.1. Le stress

2.1.1. Historique et définition

Le mot « stress » vient du latin *stringere* qui signifie, « serrer », « presser ». Au XVIIe siècle, la notion de stress veut dire « état de détresse » et renvoie à l'idée d'oppression, de dureté de vie. La science va ensuite s'approprier ce concept qui est d'abord utilisé en physique métallurgique : la contrainte (stress) exercée sur un matériau provoque une déformation de celui-ci. Si cette contrainte devient excessive, le matériau se déforme de façon irréversible. Le terme « stress » renvoie donc à une adaptation contrainte où l'excès de contrainte est délétère.

Rapidement, une analogie apparaît entre la notion utilisée en physique et les phénomènes observés en biologie. En effet, des situations excessivement agressives pourraient provoquer un stress important entraînant des maladies physiques ou mentales. Ainsi au XIXe siècle, le cardiologue canadien William Osler démontre qu'un travail pénible associé à de lourdes responsabilités induit une tension cardiaque et vasculaire dont la persistance est susceptible de provoquer l'apparition de pathologies.

Au XXe siècle, l'application du concept de stress aux organismes vivants va se généraliser en résonance avec les notions d'homéostasie et d'adaptation, formalisées en 1915 par le physiologiste américain Walter Cannon, qui découvre un des facteurs de la réponse physiologique au stress, la noradrénaline.

La notion de stress a été rendue populaire en 1936 par le médecin canadien Hans Selye qui a démontré l'existence, chez l'homme et l'animal, d'une réponse physiologique stéréotypée permettant l'adaptation de l'individu à l'ensemble des situations stressantes dans le but de maintenir l'homéostasie. Cette réaction met en jeu le système nerveux sympathique ainsi que les hormones de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Selye conclut alors que toutes ces manifestations hormonales et neurologiques sont des indices objectifs de la réponse de l'organisme au stress. Afin de ne pas donner au stress un sens univoque, Selye distingue l'« eustress », (stress positif, qui s'accompagne d'émotions positives comme le bien-être, l'excitation ou la satisfaction, avec un sentiment de contrôle de la situation) et le « distress », (stress désagréable qui peut se traduire par un sentiment de frustration voire de détresse). La psychologie s'intéresse essentiellement au « distress » qui, par ses effets négatifs, a des répercussions néfastes sur la santé. On distingue le stress homotypique (stress répété toujours de même nature) et le stress hétérotypique (stress de différentes natures).

L’étude des liens entre stress, homéostasie et adaptation (réussie ou non) constitue l'approche biologique du stress.

Depuis les travaux de Selye, de nombreux travaux scientifiques ont été publiés sur le stress. A partir de 1970, la définition même du stress s’est élargie : on est passé d’un modèle purement physiologique et biologique à un modèle plus complexe, mais plus proche de la réalité : le modèle biopsychosocial.

Dans un premier temps, des travaux ont montré que les réactions au stress sont modulées selon l’importance des facteurs émotionnels ; c’est ainsi que le stress a été envisagé comme étant un processus multifactoriel définissant des relations entre des composantes affectives, sensorielles, endocriniennes, comportementales et sociales. Au modèle biologique linéaire se substitue donc un modèle plus complexe et dynamique faisant interagir une multitude de facteurs pour expliquer l’impact d’un événement stressant sur l’organisme. Dans cette perspective, le stress a été redéfini, en 1985 (Lazarus *et al.*, 1985) comme « une interaction entre l’environnement et l’individu dans laquelle la situation est évaluée comme débordant les ressources de l’organisme et pouvant le mettre en danger ». Cette définition est axée sur des perceptions ; évaluation que fait l’individu de la situation stressante et des ressources dont il dispose pour y faire face. Elle se traduit par une altération du bien-être et peut conduire à des stratégies d’ajustement émotionnelles et comportementales. Ainsi, l’individu peut être considéré comme un acteur capable de moduler l’impact des agents stressants par des stratégies émotionnelles et comportementales. Le stress devient alors « une relation entre un environnement donné et une situation donnée dans laquelle l’individu considère que les sollicitations de l’environnement mettent à l’épreuve ou dépassent ses capacités d’ajustement ». Dans le même temps et en parallèle à cette évolution sur la compréhension psychologique du stress, les progrès des neurosciences ont permi de mieux étudier et de mieux comprendre les phases initiales des réactions de stress : en effet avant de mettre en jeu des réactions hormonales, le stress provoque des réactions émotionnelles. La toute première étape de la cascade qui engendre les réactions biologiques au stress est en réalité l’interprétation subjective du stimulus stressant. Elle se fait surtout grâce à des structures cérébrales que l’on nomme « cerveau limbique », qui reçoit des informations des régions sensorielles. Le cerveau limbique est le centre des émotions. Aujourd’hui, le stress est un phénomène à la fois biologique, psychologique et social.

2.1.2. Le syndrome général d'adaptation

Quel que soit le stress subi par l'organisme, la réaction au stress et les dérégulations qui peuvent s'en suivre sont les mêmes. Ceci a été pour la première fois observé par Selye qui les a regroupés sous l'appellation de « syndrome général d'adaptation ».

La réaction de stress se déclenche lorsque le cerveau perçoit un stress dans son environnement. Elle est caractérisée par une mise en œuvre de mécanismes d'adaptation centraux et périphériques qui comprend principalement la libération de noradrénaline dans le SNC (système nerveux central), ainsi qu'une activation du système sympathique, puis de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HPA) débouchant sur la libération dans le sang des hormones surrénaliennes, respectivement les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et les glucocorticoïdes tels que le cortisol chez l'homme ou la corticostérone chez les rongeurs. En parallèle, l'hormone neurotrophique (NGF), augmentée suite à la survenue d'un évènement stressant, est capable d'activer l'axe HPA. De plus, la stimulation de l'hypophyse lors d'un stress permet la sécrétion de la prolactine et de l'hormone de croissance (GH, **fig. 16A**).

Ces réactions s'enchaînent en trois grandes phases : la phase d'alarme, la phase de résistance et la phase d'épuisement.

2.1.2.1. La phase d'alarme

Elle est caractérisée par une activation du système nerveux autonome sympathique ainsi que par une activation du système noradrénergique central. Cette phase correspond à une réaction intense et rapide de l'organisme face à l'agent stresseur. C'est la première réaction physiologique de l'organisme face au stress. Deux grandes réactions se déroulent en parallèle :

- L'activation du système nerveux autonome sympathique :

Lors de la réaction de stress, la composante sympathique du système nerveux autonome est stimulée par l'hypothalamus périventriculaire. Cette stimulation se fait directement par voie nerveuse et induit au niveau de la médullosurrénale la libération des catécholamines dans le sang, l'adrénaline et noradrénaline. Ces hormones ont pour fonctions principales d'augmenter la température corporelle et la pression artérielle, d'accélérer le rythme cardiaque, de favoriser l'apport d'oxygène aux muscles et d'augmenter la glycémie

par glycogénolyse afin de mobiliser l'énergie nécessaire pour la fuite ou le combat (Mercier *et al.*, 2003 ; Márquez *et al.*, 2004 ; Bouwknecht *et al.*, 2007).

- L'activation du système noradrénergique central

Dès que l'organisme est soumis à un stress, le système noradrénergique du SNC s'active rapidement sous le contrôle du *locus coeruleus*, petite structure du *tegmentum* dorsal projetant vers l'ensemble du SNC (**fig. 16B**). En effet, c'est dans le *locus coeruleus* que partent la grande majorité des neurones qui utilisent la noradrénaline comme neurotransmetteur. Cela a pour conséquence une augmentation de la vigilance et du fonctionnement cérébral permettant une meilleure adaptation de l'individu à la situation stressante (Tafet & Bernardini, 2003).

2.1.2.2. La phase de résistance

La phase de résistance au stress se met en place si le stress perdure. Elle est caractérisée par la présence de corticoïdes dans le sang suite à l'activation de l'axe HPA. Les neurones neurosécrétoires de l'hypothalamus paraventriculaire libèrent la corticolibérine (CRH) dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. La CRH va rapidement atteindre l'hypophyse antérieure où elle va stimuler la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) dans le sang. Ensuite l'ACTH agit au niveau de la corticosurrénale entraînant la libération des glucocorticoïdes (synthétisés à partir du cholestérol) dans le sang. On distingue les glucocorticoïdes (cortisol, corticostérone) destinés à mobiliser les réserves d'énergie sous forme d'hydrate de carbone et les minéralocorticoïdes comme l'aldostérone qui interviennent dans l'homéostasie ionique en favorisant par exemple la conservation du sodium dans le sang et l'inflammation. Le glucocorticoïde principalement libéré chez l'homme est le cortisol alors que c'est la corticostérone qui joue le même rôle physiologique chez le rongeur. Ces hormones lipophiles passent facilement la barrière hémato-encéphalique pour agir au niveau du SNC. Elles régulent ainsi l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire en exerçant un rétrocontrôle sur l'activité sécrétrice de la CRH par l'hypothalamus (**fig. 16A**). Il existe deux types de récepteurs cytosoliques neuronaux aux corticoïdes : les GR (Glucocorticoïd Receptors) et les MR (Mineralocoricoïd Receptors) dans le septum, l'hippocampe et l'amygdale. Les GR sont très concentrés dans les régions de contrôle de la réponse hormonale au stress telles que l'hypophyse et l'hypothalamus. La corticostérone à environ 10 fois plus d'affinité pour le MR que pour le GR. Ainsi, le GR fixe la corticostérone seulement

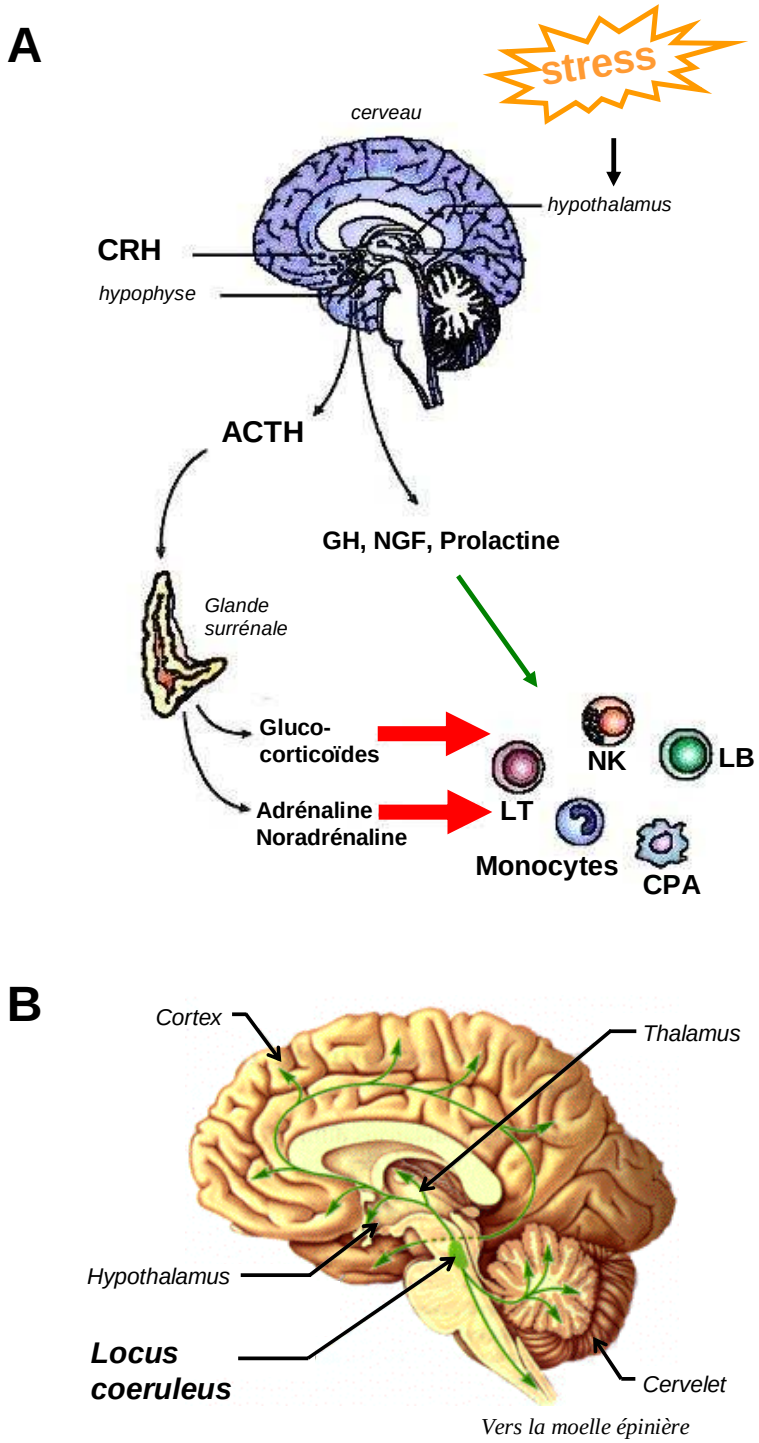


Figure 16. (A) Réaction physiologique au stress chez les mammifères. Lorsqu'un stress est perçu par le cerveau, la CRH est libérée par l'hypothalamus et va agir au niveau de l'hypophyse. Celle-ci va alors synthétiser l'ACTH qui va agir au niveau de la glande surrénale. Il y aura alors libération des cathécholamines ainsi que des corticoïdes qui ont un effet inhibiteur (flèches rouge) sur les cellules du système immunitaire. En parallèle, l'hypophyse va également libérer d'autres hormones telles que la GH, le NGF ou encore la prolactine, qui exercent un effet activateur des cellules du système immunitaire (flèche verte). **(B)** Système noradrénergique du SNC. Le *locus coeruleus* projette la noradrénaline dans l'ensemble du SNC (flèches vertes) lors de la perception d'un stress par le cerveau.

lorsqu'elle est présente en forte concentration, c'est à dire lors du pic journalier et lors d'un stress (Korte, 2001). Les corticoïdes agissent notamment au niveau du cerveau en se fixant sur leurs récepteurs pour favoriser la mémorisation de l'événement stressant. Le cortisol permet de mobiliser l'énergie de l'organisme en inhibant les fonctions physiologiques inutiles à la survie immédiate telles que la fonction reproductrice ou encore le système immunitaire.

La prolactine, ainsi que l'hormone de croissance, sont également des hormones hypophysaires dont la sécrétion a été retrouvée modifiée par des évènements stressants. Leur production semblerait altérée ou augmentée selon le type de stress subi par l'organisme (Gala, 1990 ; Malarkey *et al.*, 1991 ; Tomei *et al.*, 2006).

Le NGF est une hormone qui a été trouvée augmentée dans le plasma suite à un stress (Hadjiconstantinou *et al.*, 2001 ; Aloe *et al.*, 2002). De plus, cette hormone est capable d'agir sur l'hypothalamus afin d'activer l'axe HPA (Scaccianoce *et al.*, 1993). Ainsi, cette hormone joue un rôle important dans la réponse physiologique au stress puisqu'elle peut amplifier l'activité de l'axe HPA.

Notons que la réponse de l'axe HPA à un stress particulier est maximale lors de la première survenue de ce stress et une désensibilisation rapide et durable de cet axe survient à la présentation d'un stress homotypique. Cette désensibilisation, généralement interprétée comme une habituation de l'individu à la situation de stress, se caractérise par une moindre libération d'ACTH dans le sang et un retour plus rapide des glucocorticoïdes à leur niveau plasmatique basal. Par exemple, cette désensibilisation reste effective 18 jours après la première séance de stress chez le rongeur (Belda *et al.*, 2004) ; bien que cela semblerait dépendre de la sévérité du stress subi (Bhatnagar & Dallman, 1998). En revanche, la présentation d'un stress hétérotypique aura tendance à renforcer l'intensité de la réaction au stress. Ainsi, lorsqu'on soumet un rat à un protocole de stress varié et imprédictible pour l'animal, on n'observe pas d'habituation au stress (Harris *et al.*, 2004).

2.1.2.3. La phase d'épuisement

Cette phase survient si le stress se répète trop souvent ou dure trop longtemps. Dans ce cas, l'organisme entrant dans cette phase ne s'adapte plus, ce qui peut être délétère pour celui-ci. La baisse des défenses immunitaires, la consommation des ressources énergétiques et les

nombreuses dérégulations physiologiques liées à la réaction de stress pourraient être des facteurs explicatifs de cet épuisement de l'organisme face au stress.

L'épuisement de l'organisme peut s'observer à travers plusieurs modifications physiologiques, comme :

- des ulcérations gastro-intestinales,
- une augmentation de la taille du cortex surrénalien,
- une absence de prise de poids (Marin *et al.*, 2007),
- un niveau plasmatique élevé de glucocorticoïdes du à l'altération du rétrocontrôle négatif de ces derniers sur l'axe HPA (Mizoguchi *et al.*, 2007),
- une réduction de la taille des organes lymphoïdes (thymus, rate, ganglions lymphatiques).

Des modifications comportementales sont également observées :

- l'anxiété, qui est un sentiment de peur sans objet, l'organisme développant une réaction au stress en l'absence d'élément stressant. Celle-ci a été mise en évidence chez le rat (Korte & De Boer, 2003). Mais cette anxiété est plus ou moins bien observée selon les auteurs : Padovan & Guimarães (2000) n'observent plus d'anxiété chez des rats après 7 jours de stress homotypique (à raison de 2h de contention par jour) ; alors que Conrad *et al.* (1999) l'ont mis en évidence chez des rats stressés par contention 6h par jour durant 21 jours.
- la dépression, qui est une perturbation du dynamisme de la vie psychique, se caractérisant par une diminution plus ou moins grave de l'énergie mentale, marquée entre autres par le découragement. La dépression est toujours associée à un taux plasmatique élevé de glucocorticoïdes. Le cortisol agit au niveau du SNC par l'intermédiaire des récepteurs GR et MR. Quand la sécrétion normale de glucocorticoïdes est altérée, on observe une baisse de la régulation des récepteurs GR, associée à une altération du rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Mizoguchi *et al.*, 2007). L'état dépressif est une conséquence admise d'une baisse de sérotonine dans le SNC. Or, lors d'un stress prolongé, il a été observé une recapture rapide de la sérotonine au niveau de la fente synaptique (Tafet *et al.*, 2001).

2.2. Stress et immunité

Depuis longtemps il est connu que le stress est responsable d'une altération du système immunitaire. Cette altération est principalement due aux hormones libérées dans le sang par la réaction au stress (les catécholamines et les glucocorticoïdes). Des récepteurs pour ces hormones sont retrouvés à la surface de la plupart des cellules du système immunitaire (LB, LT, cellules NK, neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques).

A titre d'exemple, il a été montré qu'un stress par amputation chez le triton (*Notophtalmus viridescens*) provoque l'augmentation des polynucléaires neutrophiles et la diminution des lymphocytes dans le sang, suggérant un rôle des glucocorticoïdes durant ce processus (Bennett, 1986). Cette hypothèse est étayée par le fait que, des phénomènes biologiques similaires ont été observés sur ces animaux traités à l'ACTH. De plus, il a été observé chez l'homme, lors de stress chroniques, une altération de l'activité de la télomérase associée à un raccourcissement des télomères dans les cellules du système immunitaire (Irwin *et al.*, 1992).

2.2.1. Effets du stress sur les phagocytes

Il a été montré que le stress est capable d'altérer les fonctions phagocytaires des macrophages chez la souris (Freire-Garabal *et al.*, 1993) et chez l'homme (Palermo Neto *et al.*, 2001). Mizobe *et al.* (1997) ont observé qu'un stress par contention durant 24 heures induit la production de glucocorticoïdes responsables d'une profonde altération de la migration des phagocytes murins (macrophages, granulocytes) au niveau du site inflammatoire. Cela est dû au fait que les glucocorticoïdes inhibent l'expression de chimioattractants tel que MCP-1. Plus récemment, Atanackovic *et al.* (2003) ont mis en évidence une altération de la fonction des phagocytes par diminution de la production des espèces réactives de l'oxygène par ces cellules, suite à un bref stress psychosocial chez l'homme. Enfin, Zivković *et al.* (2005) ont observé que les glucocorticoïdes font disparaître les granulocytes neutrophiles du sang chez le rat. De telles modifications existent aussi chez les poissons puisqu'il a par exemple été observé qu'un stress par conflit social chez la truite altère à la fois la structure et la fonction des phagocytes, notamment des polynucléaires neutrophiles (Peters *et al.*, 1991).

2.2.2. Effets du stress sur les cellules NK

Les cellules NK sont spécialisées dans l'élimination des cellules cancéreuses ou infectées par un antigène. Elles sont également capables de tuer directement des bactéries. Leur activité est donc indispensable pour combattre les infections de l'organisme. Le nombre de cellules NK ainsi que leur activité sont souvent modifiés suite à un stress (Brenner *et al.*, 1990). En revanche, si leur nombre est augmenté, leur capacité d'adhésion et leur activité cytotoxique semblent altérées suite à un stress aigu chez le singe (Rogers *et al.*, 1999). C'est également ce qui a pu être observé, par exemple, lors d'un stress par contention chez des souris infectées par le virus de l'herpès HSV-1 (Bonneau *et al.*, 1991) ou chez l'homme lors de stress psychosociaux (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984 ; 1993 ; Esterling *et al.*, 1994 ; 1996).

La dépression est aussi responsable de l'altération de l'activité des cellules NK (Irwin *et al.*, 1992).

2.2.3. Effets du stress sur les lymphocytes T

Chez l'homme, comme chez la plupart des mammifères, des stress psychosociaux provoquent la baisse du nombre de LT totaux dans le sang (Gust *et al.*, 1992 ; Stefanski *et al.*, 2001). La capacité des cellules T à proliférer en réponse à la présentation d'antigènes viraux est également altérée (Glaser *et al.*, 1993). Les mêmes observations ont été faites lors d'un état dépressif chez l'homme (Pariante *et al.*, 1997). Une expérience menée sur des rats a pu montrer qu'un stress psychosocial induit une modification de la migration des lymphocytes (Stefanski *et al.*, 2001) suggérant que ces cellules voient leur migration potentiellement altérée vers le site infectieux lors de l'intrusion d'un antigène. De plus, Zivković *et al.* (2005) ont montré chez le rat que les glucocorticoïdes sont responsables de l'apoptose des thymocytes, surtout ceux du cortex des lobules thymiques contenant des cellules encore immatures, ce qui aboutit à une diminution drastique des LT sanguins.

2.2.4. Effet du stress sur les lymphocytes B

Le stress affecte les taux d'immunoglobulines sériques en l'absence d'infection. Par exemple, il a été observé chez l'homme une augmentation des IgA sériques lors d'un stress psychosocial. Cependant, il n'y a pas eu de modification des taux plasmatiques d'IgG et d'IgM lors de cette étude (Glaser *et al.*, 1986 ; 1990). Chez la souris infectée par un virus, un stress physique altère le taux plasmatique d'IgM (Kusnecov *et al.*, 1992). En 1997, une étude menée sur la souris a montré qu'un stress physique de contention durant 12h diminue la capacité de production d'IgG et d'IgE suite à une immunisation (Fukui *et al.*, 1997). Des stress physiques aigus chez le poisson ont pu montrer une diminution réversible du nombre de LB circulants (Engelsma *et al.*, 2003). Par contre, chez la souris, la production d'IgG est augmentée suite à un stress physique aigu tandis qu'elle est altérée si ce stress perdure (Silberman *et al.*, 2003).

2.2.5. Effet du stress sur les cytokines

Les cytokines sont des molécules synthétisées par plusieurs types cellulaires. On distingue les cytokines Th1 (notamment l'IL1, l'IL2 et l'l'IFNγ), produites par les LTh1, et les cytokines Th2 (IL4, IL5, IL10, IL13 principalement), produites par les LTh2. Chez l'homme, les stress psychosociaux sont souvent associés à une baisse de l'IL2 plasmatique ou

de son récepteur (exprimé à la surface des lymphocytes), ainsi que de l'IFNγ (Glaser *et al.*, 1990). D'une manière générale, les glucocorticoïdes sont responsables d'une inhibition de la production des cytokines Th1 et d'une activation de l'expression des cytokines Th2 (Elenkov & Chrousos, 1999 ; Calcagni & Elenkov, 2006). Une étude menée récemment sur des bovins a montré qu'un stress chez des jeunes veaux par sevrage précoce entraîne une augmentation plasmatique de cortisol associée à une augmentation de TNFα et une baisse d'IFNγ dans les premiers jours de stress (Kim *et al.*, 2011). Une autre étude, menée sur des sportifs de haut niveau, a pu mettre en évidence que l'entraînement intensif induit un stress qui se caractérise notamment par une altération de la production d'IL1β, IL6, IL12, TNFα et MIP1β lors d'une stimulation *in vitro* des granulocytes neutrophiles et des monocytes plasmatiques (Morgado *et al.*, 2011).

2.2.6. Effet du stress sur la réactivation de virus latents

Le système immunitaire étant affaibli par les hormones du stress, il est logique de constater une réactivation de virus latents tels que le virus d'Epstein-Barr (Coskun *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2010). Chez la souris infectée par le virus de l'herpès en cycle lysogène, un stress physique ou social induit la réactivation de ce virus en cycle lytique (Padgett *et al.*, 1998 ; Huang *et al.*, 2011). Chez l'homme, des situations de stress psychosociaux s'accompagnent d'une augmentation des anticorps dirigés contre les protéines virales de l'EBV, du CMV ou du HSV-1 (Glaser *et al.*, 1993). Des études *in vitro* ont montré que la CRH, l'ACTH ou encore les glucocorticoïdes sont capables de réactiver l'EBV (Cacioppo *et al.*, 2002).

2.2.7. Effets bénéfiques du stress pour le système immunitaire.

Toutes les études précedentes ont largement démontré l'impact délétère des stress sur le système immunitaire de l'homme ou des animaux. La prolactine, l'hormone de croissance ou encore le NGF sont également capables d'agir sur les cellules du système immunitaire. Contrairement aux catécholamines ou aux glucocorticoïdes, ces hormones auraient un effet immunostimulateur et auraient pour rôle de contrecarrer les effets délétères des glucocorticoïdes (Dorshkind & Horseman, 2001 ; De Bellis *et al.*, 2005).

Par exemple, il a été suggéré que l'hormone de croissance agirait comme une cytokine en favorisant la prolifération des cellules lymphoïdes. Ainsi, elle stimulerait la production d'anticorps, l'activité des cellules NK et maintiendrait l'activité des macrophages (Kooijman *et al.*, 1996).

La prolactine, dont les récepteurs sont exprimés à la surface des monocytes, des cellules B, T et NK (Russell *et al.*, 1985 ; Matera *et al.*, 1988) favorise l'expression du récepteur à l'IL2, l'activité des cellule NK ainsi que la prolifération des lymphocytes (Kelley *et al.*, 1992 ; Carreño *et al.*, 2004 ; Carreño *et al.*, 2005 ; Biswas *et al.*, 2006). Cette hormone a la capacité de contrecarrer les effets immunosuppresseurs des glucocorticoïdes (Kelley & Dantzer, 1991).

Le NGF est une hormone impliquée dans les mécanismes de régulation de la prolifération, du développement, de la différenciation et de l'activation du système immunitaire (Vega *et al.*, 2003). Les récepteurs au NGF sont exprimés à la surface des lymphocytes B et T chez l'homme (Ehrhard *et al.*, 1993 ; Torcia *et al.*, 1996 ; Melamed *et al.*, 1996 ; Lambiase *et al.*, 1997). Plus précisément, cette hormone favorise la prolifération et la différenciation des lymphocytes et serait même un facteur de survie des LB. Des études menées sur les lymphocytes ont montré que le NGF à un effet prolifératif et favorise la différenciation des cellules B en plasmocytes (Otten *et al.*, 1989).

L'effet bénéfique de ces molécules sur le système immunitaire n'est cependant pas assez puissant pour contrecarrer entièrement les effets immunosuppresseurs des glucocorticoïdes.

3. EFFETS DES VOLS SPATIAUX SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

3.1. Le vol spatial, source de nombreux stress

Les vols spatiaux sont source de nombreux stress, qu'ils soient aigüs ou chroniques, physiques ou psychosociaux. Les stress physiques sont notamment :

- une variation importante de la gravité (augmentée brusquement lors du décollage et de l'atterrissage ; diminuée de manière chronique durant le séjour spatial),

- des radiations cosmiques (particules chargées de haute énergie), des rayonnements UV et γ en dehors de l'atmosphère terrestre,

- une perturbation du rythme circadien durant le séjour dans l'espace (Mallis & DeRoshia, 2005),

- une augmentation brutale et transitoire de la température dans l'habitacle des véhicules Soyouz lors du décollage et lors de la réentrée dans l'atmosphère avant l'atterrissage. Dans cet habitacle, l'air y est confiné et recyclé ce qui favorise aussi une augmentation de CO_2.

Concernant les stress psychosociaux, il y a le confinement, l'isolement social ou encore la peur permanente d'une avarie fatale pour l'ensemble de l'équipage.

L'adaptation de l'organisme à la microgravité et la réadaptation à la gravité terrestre après un séjour en micropesanteur ont été décrits comme étant des évènements stressants car il a été constaté une augmentation du taux plasmatique de certaines hormones de stress (adrénaline et noradrénaline) chez les spationautes après le décollage et l'atterrissage.

3.2. Impact sur les systèmes biologiques différents du système immunitaire

Tous les stress générés par un vol spatial ont des effets délétères sur l'ensemble des organes du corps humain (**figure 1 de la publication 1**).

La microgravité est le principal facteur qui perturbe la physiologie. Elle touche les récepteurs de la gravité de l'oreille interne, les récepteurs mécaniques des muscles et des articulations, les capteurs de pression de la peau et affecte la répartition des fluides corporels. Les otolithes de l'oreille interne ne sont plus soumis à la gravité. Le sujet est alors désorienté et les yeux deviennent les seuls organes de l'équilibre. L'ensemble des modifications sensorielles provoque le mal de l'espace, semblable au mal des transports sur Terre et caractérisé par des maux de tête, une perte d'appétit, des nausées et des vomissements.

La microgravité provoque également une modification de la répartition des fluides corporels. En effet, sur Terre, la pression hydrostatique dans le corps est importante au niveau des pieds et plus faible au niveau de la tête, en position debout. En micropesanteur, cette pression hydrostatique est absente et les fluides corporels se répartissent uniformément dans tout l'organisme. Ainsi, le volume des fluides augmente dans la partie haute du corps et diminue dans la partie inférieure. Cela a pour conséquences notamment de congestionner les poumons et la face. L'organisme s'adapte en augmentant la vitesse de filtration glomérulaire rénale, ce qui provoque une perte en eau. Le plasma est moins abondant ce qui réduit le volume vasculaire. L'hématocrite est alors élevé et l'organisme compense par un arrêt de la production des globules rouges, ce qui provoque, au retour sur Terre, une anémie. La force gravitaire terrestre n'est plus exercée sur les éléments structuraux de l'organisme (muscles squelettiques et os) qui s'atrophient car ils ne sont plus sollicités. Les pertes osseuses peuvent favoriser l'apparition de lithiases rénales (White, 1998).

Le rythme circadien des astronautes est également perturbé car la fréquence et la durée de l'altérnance du jour et de la nuit est modifiée, ce qui, associé à une charge quotidienne de travail à bord élevée, induit de la fatigue (White, 1998).

Enfin, le confinement est source d'anxiété, qui, mêlée à la fatigue, favorise la tension entre les membres d'équipage (White, 1998).

3.3. Impact sur le système immunitaire

Tous ces stress ont des effets immunosuppresseurs ce qui compromet les défenses face aux infections et aux tumeurs. Ainsi, lors des missions Apollo et Skylab, les astronautes ont présenté des fonctions immunitaires altérées et une vulnérabilité accrue face aux infections (Kimzey *et al.*, 1976). Ce risque d'infection est d'autant plus important que l'air est recyclé en permanence à bord d'un vaisseau spatial. Le risque d'exposition aux pathogènes ainsi que le risque de transmission entre les membres d'équipage est alors accru (Pierson *et al.*, 1995 ; 1996). Toutefois, les projets de missions de très longue durée continuent de se développer. Un vol vers Mars, dont le temps de trajet aller-retour durera environ 520 jours, est envisagé. Il devient donc important d'approfondir nos connaissances sur les altérations du système immunitaire associées aux vols spatiaux de longue durée afin d'assurer la survie des astronautes. La publication ci-après présente les effets d'un vol spatial sur la croissance et la virulence microbienne, l'immunité innée et adaptative. Cette publication, résumée ci-après, démontre la nécessité d'améliorer nos connaissances des effets des vols spatiaux sur le système immunitaire avant d'entreprendre des voyages prolongés dans l'espace.

3.3.1. Croissance, résistance et virulence microbienne

Des études ont montré qu'à bord de la station spatiale Mir, il y avait 234 espèces de bactéries et champignons microscopiques, provenant presque exclusivement de la flore commensale humaine. De plus, il a été constaté qu'un échange de flore intestinale peut avoir lieu entre les membres d'équipage (Ilyin, 2005). Dans ce lieu confiné où l'air est recyclé, le risque de transmission de bactéries pathogènes entre individus est donc plus élevé. Il a ainsi pu être démontré chez l'homme une contamination inter-individuelle par *Staphylococcus aureus* durant un séjour spatial (Pierson, 2001).

Par ailleurs, plusieurs études on montré que la croissance de certains microorganismes tels que *Salmonella enterica*, *Escherichia coli, Cupriavidus metallidurans* et *Bacillus subtilis* est modifiée lors de vols spatiaux (Taylor, 1974). D'autres études ont démontré que la microgravité affecte la physiologie des microorganismes, leur expression génique et leur pathogénicité (Hammond *et al.*, 2000). En effet, les bactéries prolifèrent plus rapidement en microgravité que sur Terre. De plus, il a été clairement montré que la croissance de certaines bactéries pathogènes est favorisée par les catécholamines (adrénaline, noradrénaline, Kinney *et al.*, 2000 ; Belay *et al.*, 2003). Il semble donc être plus facile pour les microbes d'établir des foyers infectieux dans ces conditions car les missions spatiales stimulent leur croissance et ont un impact négatif sur les fonctions immunitaires. De plus, les antibiotiques sont moins efficaces dans l'espace (Tixador *et al.*, 1994) et la virulence microbienne est augmentée. En effet, plusieurs études ont rapporté une augmentation de la virulence et de la survie de bactéries cultivées durant un vol spatial, par modification d'expression de certains gènes clés intervenant dans la croissance et la virulence (Nickerson *et al.*, 2000 ; Chopra *et al.*, 2006).

3.3.2. Organes lymphoïdes et sous-populations cellulaires

Plusieurs études ont montré qu'un vol spatial affecte les organes lymphoïdes. (Durnova *et al.*, 1976) ont ainsi observé une hypoplasie des organes lymphoïdes (thymus, rate et ganglions lymphatiques) chez des rats ayant subi un vol spatial de 22 jours. Similairement, (Gridley *et al.*, 2003) ont observé que des souris ayant volé durant 12 jours ont une masse splénique plus faible par rapport aux souris élevées dans des conditions similaires sur Terre et aux contrôles élevées dans des conditions standard. Ces observations ont été confirmées par une étude plus récente (Baqai *et al.*, 2009) montrant que des souris ayant volé durant 13 jours ont un thymus et une rate de masse plus faible. Néanmoins, les résultats concernant la masse thymique sont plus variables. En effet, suite à un séjour spatial, celle-ci est parfois réduite

(Durnova *et al.*, 1976 ; Baqai *et al.*, 2009), augmentée (Pecaut *et al.*, 2000) ou similaire aux contrôles restés sur Terre (Congdon *et al.*, 1996 ; Chapes *et al.*, 1999).

De nombreux travaux ont également montré qu'après un vol spatial, les populations de leucocytes sont modifiées dans le sang des astronautes et des animaux ainsi que dans les organes lymphoïdes d'animaux. Ces changements peuvent être dues à une modification de l'expression des molécules d'adhésion (Grove *et al.*, 1995 ; Stowe *et al.*, 1999) et/ou à la redistribution des fluides corporels en microgravité (Vernikos, 1996). Par exemple, une augmentation du nombre de neutrophiles circulants est généralement observée à l'atterrissage chez les astronautes et les animaux. Le stress généré par l'atterrissage peut expliquer cette observation en provoquant une mobilisation des neutrophiles de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. Pour les autres populations cellulaires, des résultats variables ont été obtenus (**table 1 de la publication 1**), probablement à cause de différences dans la conception des expériences (marqueurs utilisés pour quantifier les cellules, durée du vol, variabilité individuelle, espèces utilisées lors de la mission, conditions d'élevage).

3.3.3. Immunité innée

Les fonctions des cellules de l'immunité innée sont également affectées par un vol spatial. Par exemple, les monocytes des astronautes ont une capacité réduite à phagocyter des bactéries *E. coli* (Kaur *et al.*, 2005). De plus, leur réponse au LPS est modulée par les stress associés aux vols spatiaux (Kaur *et al.*, 2008). Par ailleurs, les cellules NK ont une activité cytotoxique diminuée chez les astronautes et les animaux ayant volé (Rykova *et al.*, 1992 ; Konstantinova *et al.*, 1995 ; Mehta *et al.*, 2001). Le nombre de cellules souches myéloïdes des lignées granulocytaires et monocytaires de la moelle osseuse est diminué suite à un vol spatial (Ichiki *et al.*, 1996). La réactivation de certains virus latents comme les virus de l'herpès (Stowe *et al.*, 2001) ou de la varicelle (Cohrs *et al.*, 2008) a également été constatée durant un vol spatial. Ces réactivations de virus latents sont corrélées à une diminution de la production d'IFNγ, cytokine prépondérante lors d'une infection virale (Sonnenfeld, 1994 ; Crucian *et al.*, 2000) et à des taux élevés d'hormones de stress (Meehan *et al.*, 1993 ; Aviles *et al.*, 2005 ; O'Donnell *et al.*, 2009). L'IFNγ n'est pas la seule cytokine altérée lors d'un vol spatial. En effet, les vols spatiaux amplifient les mécanismes anti-inflammatoires car il a été montré que les splénocytes des souris de la mission STS-118 produisent plus d'IL6 et d'IL10 et moins de TNFα que les splénocytes des souris contrôles suite à une stimulation au LPS (Baqai *et al.*, 2009).

3.3.4. Immunité adaptative à médiation cellulaire

Plusieurs groupes ont montré que l'activation des lymphocytes T est fortement inhibée en microgravité (Konstantinova *et al.*, 1973 ; Cogoli *et al.*, 1984 ; Nash & Mastro, 1992 ; Sonnenfeld *et al.*, 1998 ; Gridley *et al.*, 2009). Cette inhibition de l'activité des LT est due à plusieurs facteurs.

Premièrement, il a été observé que l'expression génique de l'IL2 et de son récepteur sont perturbées *in vitro* et *in vivo* en microgravité réelle et simulée (Cogoli *et al.*, 1993 ; Pippia *et al.*, 1996 ; **figure 2 de la publication 1**).

Deuxièmement, les lymphocytes T ont une mobilité augmentée en microgravité, même en absence de mitogène, alors que la mobilité des monocytes est sévèrement diminuée en microgravité simulée. Ceci pourrait gêner l'interaction entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigène et donc l'activation de la voie B7/CD28 (**figure 2 de la publication 1**).

Troisièmement, l'inhibition de l'activation des LT peut également provenir de l'altération de signaux intracellulaires. En effet, le cytosquelette, la PKA ou la PKC, très impliqués dans la transduction du signal des LT, sont sensibles à la gravité (Ingber, 1999). Il a pu être observé, par exemple, une altération de la distribution des isoformes de la PKC (Schmitt *et al.*, 1996 ; Hatton *et al.*, 2002) et une diminution de l'activité de la PKA en microgravité (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2005) ce qui a pour conséquence la non activation de certains facteurs de transcription tels que NFkB, CREB, STAT1 et AP1, impliqués notamment dans la transcription des gènes responsables de la prolifération cellulaire.

L'activité altérée des LT humains suite à un vol spatial se traduit également par une altération du ratio IFNγ/IL10 suite à leur activation par des mitogènes *in vitro* (Crucian *et al.*, 2008). Une étude similaire chez la souris a révélé une baisse de la production des cytokines Th1 (IL2 et IFNγ) après un séjour dans l'espace (Gridley *et al.*, 2003). Crucian *et al.* (2000) ont observé chez l'homme, au retour d'un séjour dans l'ISS, une réduction du ratio IFNγ/IL10 sans modification du niveau d'IL4 sérique. D'une façon générale, les études portant sur les cytokines suite à un vol spatial ont mis en évidence une baisse de la production des Th1 et une augmentation des Th2, ce qui suggère une augmentation de l'activation des LB.

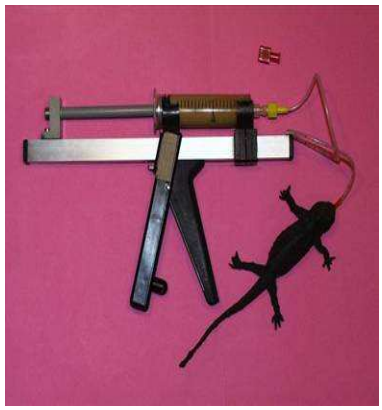
3.3.5. Immunité adaptative à médiation humorale

Par rapport à l'immunité naturelle ou cellulaire, peu de données existent dans la littérature concernant les effets des vols spatiaux sur l'immunité humorale. Il ne semble pas y avoir de changement significatif des taux plasmatiques d'immunoglobulines après des vols de

courte durée (Voss, 1984 ; Stowe *et al.*, 1999) ce qui est logique au vu du temps de demi-vie des anticorps. Par contre, des résultats discordants ont été rapportés après des vols prolongés : Konstantinova *et al.* (1993) ont rapporté des taux sériques plus élevés d'immunoglobulines, particulièrement pour les IgA et les IgG, alors que Rykova *et al.* (2008) ont noté que les taux sériques d'IgA, d'IgG et d'IgM étaient inchangés après des missions prolongées.

Par ailleurs, les études concernant les effets d'un vol spatial sur la réponse immunitaire humorale induite par une stimulation antigénique sont très rares. Les seuls travaux abordant ce sujet ont été publiés récemment (Boxio *et al.*, 2005 ; Rykova *et al.*, 2008). Les auteurs de la dernière étude citée ont rapporté, chez des astronautes, des taux plasmatiques d'anticorps spécifiques de différents virus latents (HSV, CMV ou EBV). Ils ont ainsi montré que ces taux n'étaient pas modifiés par un vol de courte ou de longue durée. Afin de déterminer si la réponse immunitaire humorale est affectée par un vol spatial, le laboratoire Développement et Immunogénétique, JE2537, a réalisé l'expérience Genesis durant la mission spatiale Perseus d'avril à août 1999. Durant cette mission, des pleurodèles adultes sont restés dans la station Mir pendant 5 mois, période durant laquelle ils ont été immunisés par voie orale (**fig. 17**). A ce jour, ce sont les seuls animaux à avoir été immunisés dans l'espace. De plus, ils font partie des rares vertébrés ayant séjourné dans une station spatiale pour une période aussi longue. Les analyses menées au laboratoire ont montré que le taux d'ARNm de chaînes lourdes d'IgY (équivalent des IgA sécrétoires humaines) est trois fois plus élevé dans la rate des animaux ayant volé. Les chercheurs de la JE2537 ont également déterminé comment ces animaux ont utilisé leurs familles de gènes VH pour fabriquer leurs anticorps spécifiques en réponse à la stimulation antigénique. Les travaux ont révélé que les familles VHII et VHVI sont utilisées en réponse à cette stimulation antigénique mais dans des proportions différentes : les familles VHII et VHVI sont retrouvées respectivement dans environ 28% et 58% des chaînes lourdes d'IgM pour les animaux immunisés sur Terre et dans environ 61% et 24% des chaînes lourdes d'IgM pour les animaux immunisés à bord de Mir (**fig. 18**).

Ainsi, les vols spatiaux entraînent des modifications du système immunitaire chez l'homme et l'animal. Des vols de courte durée affecteraient plutôt le système immunitaire adaptatif à médiation cellulaire et peu celui à médiation humorale. Ce dernier est altéré suite à des vols prolongés. Enfin, les vols spatiaux sont associés à une baisse de la production des cytokines Th1 et une augmentation de la production des cytokines Th2 responsables de l'activation des lymphocytes B (Abbas *et al.*, 1996).



Immunisation

5 mois à bord de la Station Mir



5 mois sur Terre



Figure 17. Représentation schématique de l'expérience Genesis menée en 1999. Des pleurodèles adultes ont été immunisés pendant 5 mois par des protéines d'origine bovine par voie orale, à bord de la station spatiale Mir ou sur Terre.

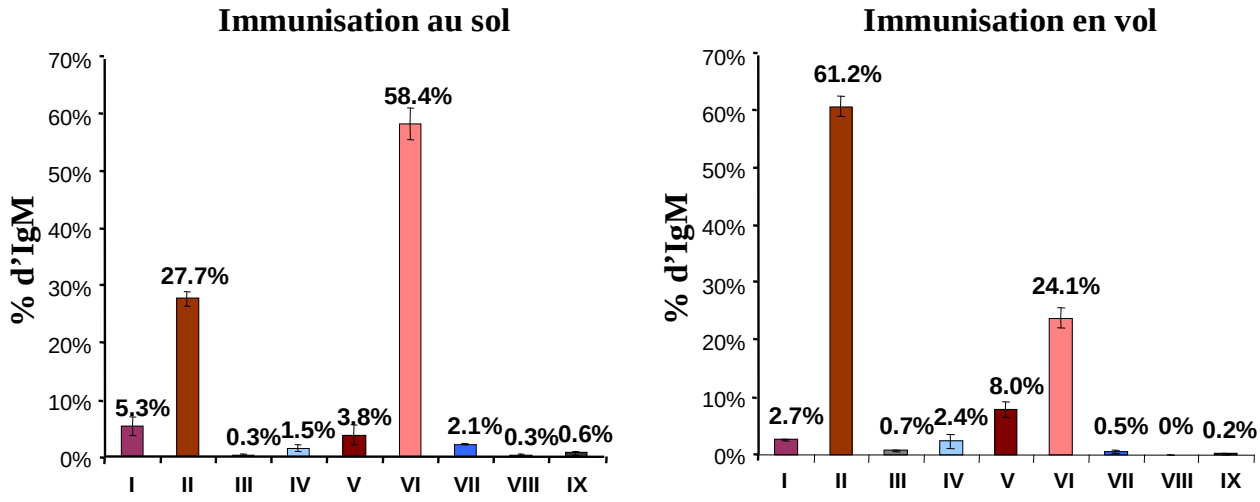


Figure 18. Utilisation des 9 familles de gènes VH pour former les paratopes des IgM spécifiques produites en réponse à la stimulation antigénique au sol ou à bord de la station Mir durant l'expérience Genesis de 1999. Tiré de Boxio *et al.*, 2005.

PUBLICATION 1

Journal of Leukocyte Biology, 2009



JLB

Review

Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit?

Nathan Guéguinou,[*,†] Cécile Huin-Schohn,*[*,†] Matthieu Bascove,*[*] Jean-Luc Bueb,*[†] Eric Tschirhart,*[†] Christine Legrand-Frossi,*[*] and Jean-Pol Frippiat*[*,1]*

*Nancy-University, Development and Immunogenetics Team, Vandœuvre-lès-Nancy JE 2537, France; and †University of Luxembourg, Life Sciences Research Unit, Luxembourg

RECEIVED JUNE 11, 2009; ACCEPTED JULY 11, 2009. DOI: 10.1189/jlb.0309167

ABSTRACT

This year, we celebrate the 40th birthday of the first landing of humans on the moon. By 2020, astronauts should return to the lunar surface and establish an outpost there that will provide a technical basis for future manned missions to Mars. This paper summarizes major constraints associated with a trip to Mars, presents immunological hazards associated with this type of mission, and shows that our current understanding of the immunosuppressive effects of spaceflight is limited. Weakening of the immune system associated with spaceflight is therefore an area that should be considered more thoroughly before we undertake prolonged space voyages. *J. Leukoc. Biol.* 86: 1027–1038; 2009.

Introduction

In 1961, Yuri Gagarin became the first human to leave the confines of Earth. Since then, over 450 people have traveled into space, but so far, only 24 astronauts (those of the Apollo missions) have traveled beyond the first 400–500 km of the low-Earth orbit, in which the magnetic field of the Earth deflects a significant fraction of radiation. Beyond the Van Allen radiation belt, where charged particles are trapped in the magnetic field of the Earth, astronauts are exposed to solar and cosmic radiation.

On July 20, 1969, Neil Armstrong and Edwin Aldrin became the first humans to land on the moon. This summer, we celebrated the 40th birthday of this historic event. A few years ago, President George W. Bush proposed a manned return to the moon, with the moon to become the staging post for manned missions to Mars [1]. President Barack H. Obama's 2010 budget request, released on February 26, 2009, confirmed that NASA will stay on track to return to the moon by 2020. A mission to Mars and back will take a minimum of 520 days, of which roughly 1 month will be spent on the martian surface, and the rest will be spent in transit. At its furthest, the crew will be some 360 million km away from home. Consequently, astronauts will have to exercise an unprecedented level of autonomy and teamwork [2]. During the mission, they will experience not only microgravity but also various forms of stress, such as confinement, high expectations of performance, and risks of equipment failure or fatal mishaps. The enormous distance and long travel time to Mars will also probably affect the astronauts psychologically. The crew will therefore endure increased stress levels, radiation, as neither the moon nor Mars has magnetic fields or dense atmospheres that could attenuate them, and microgravity-induced changes, such as alterations in body fluid distribution, which could influence their immune system. As gravity has shaped the architecture of all biological systems on our planet, it is reasonable to observe aberrations in normal functioning of life in weightlessness. A long-term spaceflight will also pose a multitude of health risks, not only those associated with spaceflight, such as bone demineralization, skeletal muscle atrophy, and immune system suppression (**Fig. 1**), but also from common diseases that might cause specific problems under these circumstances. Another risk may be the development of pathogens in a closed environment, where air, food, waste, and water are recycled. Confinement of the crew during flight can and has resulted in the transfer of microorganisms among crew members [4, 5]. Finally, specific health risks might also be encountered on the lunar or martian surface, such as dust or chemicals that could irritate the respiratory tract, for example, or even new organisms. Indeed, 3 days on the moon during the final Apollo mission in 1972 left astronaut Eugene Cernan weary and filthy with rock dust. A trip to Mars will certainly multiply the hazards of space travel.

Humans are ready to accept great risks to go where no one has gone before, but do we have sufficient and sound biologi-

Abbreviations: AHCC=active hexose correlated compound, CNES=French National Space Center, ESA=European Space Agency, Ets= E26 transformation specific, HDBR=head-down bed-rest, IML-2=International Microgravity Laboratory 2, ISS= International Space Station, PKA/PKC=protein kinase A/C, respectively, PMN=polymorphonuclear neutrophil, ROS=reactive oxygen species, SLS-1=Spacelab Life Sciences 1

1. Correspondence: Development and Immunogenetics Team, JE 2537, 9 Avenue de la Forêt de Hage, Faculté de Médecine, 5400 Vandœuvre-lès-Nancy, France. E-mail: jean-pol.frippiat@scbiol.uhp-nancy.fr

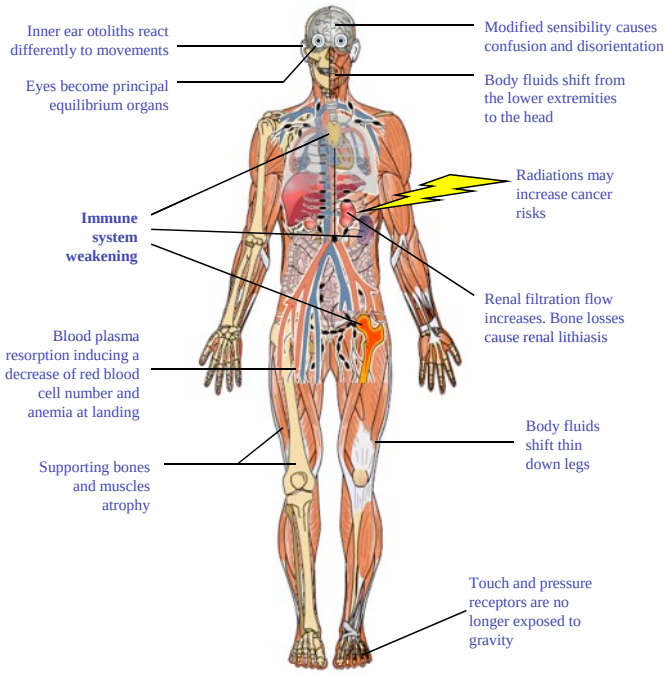


Figure 1. Spaceflight-induced alterations in the organism. During space missions, many factors combine to influence a variety of physiological functions. This schematic representation of the human body provides an overview of the most important of those functions [3].

cal information to support prolonged space habitation, knowing that no humans can exist in space for a long time without science to support them? Returning astronauts have experienced altered immune function and increased vulnerability to infections during spaceflights dating back to the Apollo and Skylab missions [6]. Consequently, one may wonder if the weakening of the immune system could be a limiting factor for the expansion of human presence beyond Earth's orbit. This question is important to ensure survival in space stations and sustain habitation on the moon and Mars. Most of our knowledge about the effects of spaceflight on the immune system results from the analysis of samples subjected to short spaceflights or ground-based simulations of spaceflight conditions. These studies revealed that spaceflights affect a variety of immune parameters in humans and in animals. In this paper, we review the effects of spaceflight on microbial growth and virulence, lymphoid organs and cell populations, and innate and adaptive immunity, and we present countermeasures that have been developed to prevent immune compromise resulting from exposure to spaceflight conditions. Taken together, these data demonstrate that the weakening of the immune system associated with spaceflight is an area that should be considered more before we undertake prolonged space voyages.

MICROBIAL GROWTH, RESISTANCE, AND VIRULENCE

Analysis of medical events among astronauts aboard the Mir space station, over a period from March 1995 to June 1998, revealed a significant number of episodes of microbial infections, including conjunctivitis and acute respiratory and dental infections [7]. Evidence for in-flight cross-contamination with opportunistic pathogens such as *Staphylococcus aureus* has been reported [8, 9]. Moreover, a study of the microflora of cosmonauts from five spaceflights indicated that the crew exchanged intestinal flora [10]. As the duration and frequency of space missions increase, the potential for infectious diseases to arise during flight may become a critical issue, as microbial contamination will increase with time and require continued surveillance. Crew members are the predominant sources of bacteria, with other sources arriving with ground-supplied materials. Data from previous spaceflights have demonstrated that microorganisms are ubiquitous throughout the habitable modules of spacecrafts [9, 11, 12]. For example, a total of 234 species of bacteria and microscopic fungi were identified in the Mir environment, and bacteria consisted primarily of commensal human integuments, i.e., *Staphylocci*, *Micrococci*, and *Coryneform* bacteria [13]. Extremophilic and extremotolerant bacteria were isolated in the spacecraft assembly and the test and launch preparation facilities [14]. As a result of their proximity to space-faring objects, these bacteria pose a considerable risk for forward contamination of extraterrestrial sites. Microbes can also affect the integrity of the spacecraft. Indeed, most of the fungal species found on structural materials includes biodegraders of polymers [13].

Changes in cell growth characteristics during spaceflight were observed a long time ago for several microorganisms such as *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis* [15]. More recently, studies have demonstrated a key role for microgravity in microbial physiology, regulation of gene expression, and pathogenesis [16, 17]. Bacteria can proliferate more readily in space, which suggests that this environment is better able to initiate growth that could lead to contamination, colonization, and infection. Furthermore, it has been shown that the growth of several bacterial strains, including *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *S. aureus*, is enhanced by catecholamines [18–20], and elevations of catecholamines and cortisol/corticosterones in the plasma are observed frequently in individuals who have flown [21]. Thus, opportunities for microbes to establish foci of infection are enhanced, especially as space travel stimulates their growth and has a negative impact on immune function.

In vitro experiments conducted in the 1980s and 1990s indicated that greater concentrations of antibiotics were generally required to inhibit microbial growth in space [22]. Antibiotics were typically less effective against suspension cultures in space, but these traits appeared to be transient, as attempts to reproduce the resistance after return to Earth have been unsuccessful [23, 24]. Various physiological, pharmacological, and pharmacodynamic changes during spaceflight can affect drug efficacy in vivo [25]. For example, a reduction in the diversity of the bacterial flora in the gastrointestinal tract may give rise to an increase in the size of the drug-resistance gene pool. It may also be facilitated by mutations induced by radiation. Indeed, high mutation frequencies in indicator genes carried by yeast have been reported after long-term spaceflight [26].

Direct evidence for a role of microgravity in microbial virulence has been provided by simulated microgravity experiments, in which increased production of heat-labile *E. coli* enterotoxin was shown [27]. Recently, Altenburg et al. [28] demonstrated that the growth of Saccharomyces *cerevisiae* and *Candida albicans* is increased under simulated microgravity and results in a morphogenic switch that is consistent with enhanced pathogenicity. These data are in agreement with a previous observation indicating that *S. cerevisiae* retrieved from Apollo 16 were better able to survive in intradermal lesions of artificially infected mice than *S. cerevisiae* grown on Earth [29]. Nickerson's groups [30, 31] performed several studies about the virulence of *Salmonella typhimurium*. They reported that *S. typhimurium* grown under spaceflight or simulated microgravity exhibited enhanced virulence, resistance to environmental stress, and survival in macrophages [30]. Studies performed on hindlimb-unloaded mice, a model used frequently to simulate some aspects of spaceflight conditions, reached the same conclusion [27]. Recently, global microarray and proteomic analyses indicated that the expression of 167 transcripts and 73 proteins of *S. typhimurium* is changed under microgravity, and the conserved RNA-binding protein, Hfq, was identified as a likely global regulator involved in the response to this environment [32]. Interestingly, it has been shown that this protein is also involved in the virulence of another pathogen, *Francisella tularensis* [33]. It is therefore evident that changes in gene expression that occur in microorganisms during spaceflight can increase their virulence.

LYMPHOID ORGANS AND CELL POPULATIONS

Several independent pieces of work have shown that spaceflight conditions affect lymphoid organs. Durnova et al. [34] observed hypoplasia of lymphoid organs (spleen, lymph nodes, and thymus) in rats that underwent a 22-day spaceflight. They demonstrated that spleen hypoplasia was a result of a reduction in lymphocytes and erythroid cell numbers and that lymph node and thymus hypoplasia were a result of a decrease in lymphocyte number. Similarly, Gridley et al. [35] noticed that after a 12-day space shuttle mission (STS-108), flown mice had smaller spleen masses in comparison with animal enclosure and vivarium controls. These observations were confirmed by a recent study [36] showing that C57BL/6 mice from a 13-day space shuttle mission (STS-118) had lower spleen and thymus masses. However, the results about the thymus mass appear to be more variable, as the thymus mass has been reported to be decreased [34, 36, 37], increased [38, 39], or similar to controls in other studies [40–42].

Many studies reported variations in the PBL populations of astronauts and animals and in the lymphoid organs of animals after spaceflights. These modifications could be mediated by changes in adhesion molecules [43, 44] and the redistribution of body fluids in the microgravity environment [45]. **Table 1** summarizes the data about leukocyte populations and shows a consistent increase in the number of neutrophils in the peripheral blood of humans and animals at the time of landing. The stress of landing could be responsible for this observation by mobilizing bone marrow PMNs into the circulation. Variable results were obtained for the other populations. Multiple reasons can explain these different results. First, markers used to quantify cells can differ between studies. For example, Gridley et al. [56] showed a decrease in B cell counts in spleens from C57BL/6 mice flown on STS-118, whereas another study [52] revealed an increase in B cell counts in spleens from C57BL/6 mice flown on STS-108. For STS-108 samples, B220 was used as a marker to identify B cells, whereas CD19 was used to quantify B cells in STS-118 samples [56]. As B220 is also found on NK cells, the increase in $B220^+$ cells noted by Pecaut et al. [52] could be a result of an increase in NK cells. On the other hand, Allebban et al. [48] and Ichiki et al. [49] observed a decrease in the number of peripheral blood B cells but no changes in spleen B cells from rats that were flown using IgG and OX33 as markers, respectively.

Another reason for these apparently contradictory results is that immunological changes are likely to depend on the duration of the spaceflight. For example, Stowe et al. [53] analyzed blood and urinary samples from astronauts who flew during 9 or 16 days (Table 1). Their study showed that the numbers of $CD4^+$ T cells and monocytes in the peripheral blood were increased after the 9-day spaceflight, which was contrary to the 16-day spaceflight, where $CD4^+$ T cell numbers were unchanged, and the monocyte numbers were lower. In parallel, they observed that the concentration of cortisol in the plasma was lower after the 9-day flight but increased after the 16-day flight. In contrast, the urinary epinephrine and norepinephrine levels were greater after the 9-day flight than after the 16-day flight, suggesting that sympathetic nervous system responses predominate after short spaceflights, and long flights are characterized by glucocorticoid-mediated changes, thus affecting the immune system differently. Another study revealed a correlation between increased epinephrine and norepinephrine levels and the number of white blood cells, monocytes, and B cells in astronauts' peripheral blood samples collected after five 4- to 16-day space shuttle missions [51].

These differences may also be a result of the fact that the number of flown individuals is reduced in some studies (see Table 1). Thus, individual variability can affect observations. For example, Chapes et al. [40] obtained different results when they studied two groups of six rats that flew for 8 days in the same animal enclosures. In particular, macrophage TNF-α secretion, blood cell distribution, bone structure, and bone mass showed inconsistent changes. These differences may be attributable to individual variability but also to variations in the flight profiles. Although the two missions were 8-day flights, the launch and landing times were different, and the animals were not dissected at the same time. One group was dissected in the evening and the other one at mid-morning. These times are close to the antithetical picks for daily circadian rhythms and could explain some differences between the missions' results, especially for stress hormones whose production depends on circadian rhythms.

Finally, the choice of species with which to perform space experiments and the rearing conditions of the animals can also affect the results. Thus, there are many variables that complicate the analysis of spaceflight-induced modifications. Fur-

TABLE 1. Spaceflight-Associated Changes in Leukocyte Populations Observed in Different Studies

Study	Flight duration	Species	*n*	Lymphocytes			Monocytes	Granulocytes	
				T cells	B cells	NK cells		Neutrophils	Eosinophiles
Taylor et al. [46]	3–18 days 11 missions	Human	41	↓ of total circulating lymphocytes at landing				↑ nb in PB at landing	% ↓ in PB at landing
	6 and 8 days	Human	11		↓ in PB at landing		↓ nb in PB at landing		
Sonnenfeld et al. [47]	14 days	Rats	5	% ↑ in BM and in S at landing		↓ nb in BM and in S at landing			
Allebban et al. [48]	9 days	Rats	29	↓ nb in PB at landing. No change in S				↓ nb in PB at landing	
Ichiki et al. [49]	14 days	Rats	15	↓ nb in PB at landing. No change in S			↓ nb in PB at landing	↑ nb in flight and at landing	
Stowe et al. [44]	8 days	Human	6	↑ of total circulating lymphocytes 2 days before launch			↓ nb in PB 2 days before launch and at landing	↑ nb in PB at landing	No changes during mission
	9 days	Human	5	↑ of total circulating lymphocytes 2 days before launch			Unusually low nb 10 days before flight	↑ nb in PB at landing	No changes during mission
	14 days	Human	5	No changes in total circulating lymphocytes during mission			↑ nb in PB at landing	↑ nb in PB at landing	No changes during mission
Chapes et al. [39]	10 days	Rats	6	nb and % ↓ in PB at landing			nb and % ↓ in PB at landing	% ↑ in PB. Neutrophilia at landing	
Chapes et al. [40]	8 days two missions	Rats	6	No change in nb and % in PB from mission 1					
				nb and % ↓ in PB at landing			nb and % ↓ in PB at landing	↑ % in PB at landing	
Crucian et al. [50]	10–18 days four missions	Human	27	No changes in total circulating lymphocytes at landing			No change in PB total nb; $CD14^+/CD16^+$ % ↓ in PB at landing	↑ nb in PB at landing	
				% ↓ in PB at landing	No significant change of PB % at landing				
Mills et al. [51]	4–7 days and 11–16 days	Human	11	↑ nb in PB at landing		↓ nb in PB at landing	↑ nb in PB at landing		No change during mission
Pecaut et al. [52]	12 days	Mice	12	↑ in BM %; ↓ in S %[a]	↓ in BM %; ↑ in S %[a]	No change in S %; ↑ in BM %[a]	No change in S % ↑ in BM %	↓ in S %; ↓ in BM %[a]	
				↑ of total lymphocytes % in S					
				No significant change in PB, S, and BM cell numbers; no significant change of PB %					
Stowe et al. [53]	9 days	Human	16	↑ $CD4^+$ nb in PB at landing	No change in PB at landing	↓ nb in PB at landing	↑ nb in PB at landing	↑ nb in PB at landing	
	16 days	Human	12	No change in PB at landing	No change in PB at landing	No change in PB at landing	↓ nb in PB at landing	↑ nb in PB at landing	
Rykova et al. [54]	125–195 days	Human	15	No change in PB at landing	No change in PB at landing	↓ % in PB at landing			

(continued on next page)

TABLE 1. ***(continued)***

Study	Flight duration	Species	*n*	Lymphocytes			Monocytes	Granulocytes	
				T cells	B cells	NK cells		Neutrophils	Eosinophiles
	8–10 days	Human	15	No change in PB at landing	↑ % in PB at landing	No change in PB at landing			
Crucian et al. [55]	12–14 days	Human	17	No change in PB at landing ↓ total lymphocytes % in PB at landing	↑ % in PB at landing	↓ % in PB at landing	No change in PB at landing	↑ % in PB at landing	
	179–215 days	Human	8	No change in PB at landing ↓ total lymphocytes % in PB at landing	↑ % in PB at landing	↓ % in PB at landing	No change in PB at landing	↑ % in PB at landing	
Gridley et al. [56]	13 days	Mice	12	↓ nb in S at landing	↓ nb in S at landing	↑ nb in S at landing			
Baqai et al. [36]	13 days	Mice	12	Number of total lymphocytes ↓ in S, no changes in %			Number ↓ in S, no changes in %	Number ↓ in S, no changes in %	

n, Number of flown individuals that was analyzed; nb, number; PB, peripheral blood; BM, bone marrow; S, spleen; ↓, decrease; ↑, increase. [a]Versus animal enclosure module ground control but not vivarium ground control. Results from long duration missions are written on a gray background.

thermore, these data indicate a high sensitivity of lymphoid organs and cell populations to differences in spaceflight conditions, as well as post-flight procedures, environment, and experimental designs.

INNATE IMMUNITY

The number, function, and development of cells involved in innate immunity are affected by spaceflight. As shown in Table 1, increases in the number of neutrophils were observed consistently after flights, which are likely a result of the stress associated with landing, and the number of peripheral blood monocytes and NK cells was lower most often. Changes in function were observed in neutrophils, monocytes, and NK cells. Neutrophil phagocytic and oxidative functions were affected by spaceflight [54, 57]. Astronauts' monocytes exhibited a reduced ability to engulf *E. coli*, elicit an oxidative burst, and degranulate [54, 58]. Moreover, it was shown that their response to gram-negative endotoxins (LPS), which they could encounter during infection, was modulated by spaceflight-associated factors [59]. This alteration in the responsiveness of the crew's monocytes could be a result of the decreased expression of CD14 and the increased expression of TLR4, as LPS responsiveness depends on the physical association of the LPS/CD14-TLR4-myeloid differentiation protein 2 complex [60, 61]. Another possible explanation is provided by the observation that the levels of the LPS-binding protein were increased in astronauts' plasma. NK cell cytotoxicity and delay in hypersensitivity skin test responses to common recall antigens were also depressed severely under spaceflight conditions [54, 62–67]. Decreased numbers of bone marrow-derived CFUs were reported for flown (CFU-monocytes and CFU-granulocytes) and hindlimb-unloaded rodents (CFU-macrophage) [47, 49, 68, 69]. In a recent study, Ortega et al. [70] studied bone marrow cells from the humerus of C57BL/6 mice after a 13-day flight (STS-118) to determine how spaceflight affects the differentiation of cells of the granulocytic lineage. Their study indicated differences among bone marrow subpopulations, increased macrophage development in the bone marrow of flown mice, and the activation of neutrophils in response to landing.

Changes in cytokine expression were observed in astronauts and flown animals, thereby providing another explanation for the weakening of natural immunity under spaceflight conditions. Of interest is the alteration of IFN production, which is a first line of defense in the case of viral infection [50, 71, 72]. For example, decreased IFN secretion and low NK cell activity were observed for lymphocytes isolated from the peripheral blood of cosmonauts after returning from a 7-day spaceflight [73]. In another study, splenocytes from rats flown for 1 week exhibited decreased IFN-γ production in response to Con A, which is a T cell mitogen [42]. Furthermore, exposure to the spaceflight environment can increase anti-inflammatory mechanisms, as LPS-activated splenocytes of mice that were flown on STS-118 produced more IL-6 and IL-10 and less TNF-α than control mice [36]. The same study showed that many of the genes responsible for scavenging ROS were up-regulated after the flight, suggesting that the cells attempted to scavenge ROS produced during spaceflight. Indeed, an increase in the superoxide response by murine PMNs was reported even after short periods of microgravity [74].

Reactivation of herpes viruses was observed during spaceflight and has been used as an indicator of the immune status of astronauts [75–78]. Recently, the reactivation of the vari-

cella zoster virus has been observed in the saliva of astronauts [79], suggesting an asymptomatic reactivation as a result of spaceflight-associated stresses. In another study, Mehta et al. [75] demonstrated that the reactivation of latent virus occurred in astronauts before the flight and that cytomegalovirus may become reactivated further during spaceflight. A decreased resistance to viruses has also been observed in hindlimb-unloaded mice. Indeed, Gould and Sonnenfeld [80] reported that female Swiss/Webster mice, which are normally resistant to infection with the D variant of encephalomyocarditis virus, showed a marked increase in susceptibility to infection when suspended, and controls showed no increase in susceptibility to the virus. This correlated with a drop in IFN production. Elevated levels of stress hormones observed in astronauts and hindlimb-unloaded mice suggest that spaceflight- and hindlimb-induced stresses may be responsible for the reactivations of latent viruses [77, 78, 81–85]. Indeed, hormones such as catecholamine, which are released during stressful situations, regulate immune functions through adrenergic receptors located on immune cells, particularly β2-type receptors [86–89]. Additionally, glucocorticoids, which are overproduced in response to stress, can alter innate and acquired immunity [21].

T CELLS IN LOW-GRAVITY CONDITIONS

In the 1970s, several investigators reported that lymphocytes from crew members on United States and Soviet missions had decreased responses to mitogens at the time of landing [90]. Similar observations were reported in rats [91–93] and in mice [56]. Cogoli's group [94] performed many studies to understand why the activation of human T lymphocytes is depressed under low-gravity conditions. In their initial experiment, cultures of purified lymphocytes were activated in-flight with Con A, a T cell mitogen. Radioactive thymidine was added to the culture to evaluate the degree of activation. This experiment revealed that lymphocytes exposed to microgravity showed almost no activation in comparison with lymphocytes activated on Earth. This observation was confirmed by three separate experiments performed in Spacelab, SLS-1, and IML-2 [95–97]. Thus, there is a strong and consistent depression of T cell activation under space conditions.

Three signals are required for full T cell activation (**Fig. 2**). The first signal is delivered by the linkage of the TCR/CD3 complex with the antigenic peptide presented on a MHC molecule by anti-CD3 antibodies or by Con A. The second signal is delivered by IL-2 secreted by the T cell itself, which is recognized by the IL-2R. The third signal is a costimulatory signal delivered by the accessory cells (usually monocytes) via the B7/CD28 interaction by anti-CD28 antibodies or by IL-1, which is secreted by accessory cells upon interaction with T cells. Then, various protein kinases, GTPases, second messengers, and transcription factors are involved in the signaling cascade.

The first possible explanation for the depression of T cell activation is that the binding of the mitogen is altered under low G conditions. To study the binding of Con A and the formation of patches and caps of Con A receptors, Cogoli's

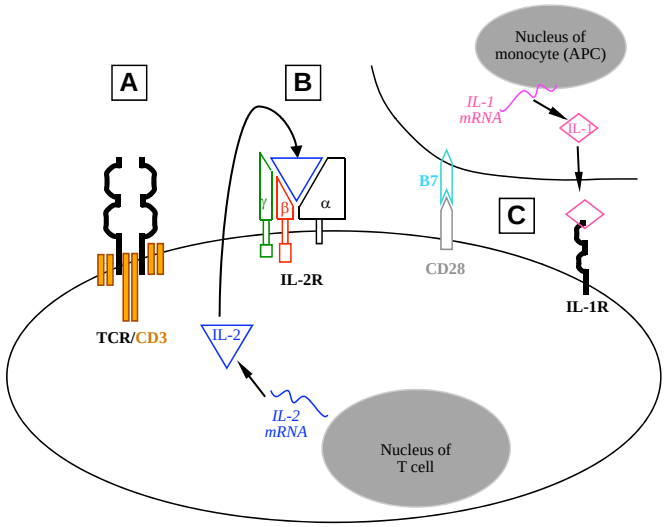


Figure 2. Signals required for full T cell activation. Three signals are required for full T cell activation. The first signal is delivered through the linkage between the TCR/CD3 complex to peptide-bound MHC molecules. The second signal is delivered by IL-2. The third signal is a costimulatory signal delivered by accessory cells or APC via the B7/CD28 interaction or by IL-1, which is secreted by accessory cells upon interaction with T cells.

groups [98, 99] performed experiments on sounding rockets. Fluorescent-labeled Con A was added to cells as soon as low-gravity conditions were established or a few minutes after the onset of microgravity. Two experiments were performed, with lymphocytes purified from human peripheral blood [98] and one with the Jurkat T cell line [99]. All demonstrated that the influence of low gravity on the delivery of the first signal of activation is rather small and that rapid processes such as mitogen binding, patching, and probably capping are not involved in the depression of the in vitro activation of T lymphocytes [100].

An alteration in the IL-2/IL-2R function may be another cause of the depression in T cell activation, as IL-2 drives T cell proliferation and differentiation into armed effector cells [101]. Experiments performed with human PBL during SLS-1 and IML-2 demonstrated that the secretion of IL-2 and the amount of IL-2R are strongly depressed under microgravity [96, 97]. An independent study confirmed that IL-2R is not expressed on the surface of cells activated in low gravity [102]. Recently, Gridley et al. [56] also noted that the IL-2 expression was decreased in mice that flew on STS-118. Moreover, when low-gravity conditions were modeled in the random positioning machine, the genetic expression of IL-2 and IL-2Rα was inhibited in Con A-activated cells [103, 104], and IL-2Rβ was not affected. These data demonstrate that the nonresponsiveness of T lymphocytes under microgravity is a result of a perturbation of the IL-2 and IL-2R gene expression and that low gravity differentially affects gene expression. The selective effect of microgravity on gene expression was confirmed by a study of early gene expression in PBL activated by Con A under microgravity [105].

The third signal needed for T lymphocyte activation is provided by IL-1 and by the contact between T cells and accessory cells. Flight studies have measured reduced and normal levels of IL-1 for cells activated with Con A under microgravity [97, 106]. However, investigations performed under simulated microgravity supported the latest findings that IL-1 secretion is not affected adversely by microgravity [103, 107]. Cell-to-cell interactions and cell motility are important for cell communication and signal delivery. Cellular interactions occur under microgravity, as aggregates of human peripheral blood lymphocytes were observed in independent space experiments [94, 108]. Nonactivated human peripheral blood lymphocytes are able to move under low-gravity conditions [106], whereas lymphocytes cultivated at 1 G show this capability only when they are activated or in the presence of a chemoattractant. Furthermore, the mean velocity of cells activated with Con A under microgravity was significantly higher than that of cells cultivated at 1G. On the contrary, Meloni et al. [109] found that the motility of J-111 monocytes is reduced severely in the random positioning machine. Significant changes in the cytoskeletal structure of these cells, which plays an important role in cell motility [110], were also observed. As T lymphocytes were found to be highly motile under microgravity, even in the absence of a mitogen, it can be argued that an impaired motility of human monocytes could hinder the delivery of the costimulatory signal to activate the B7/CD28 pathway, thereby providing a second explanation for the loss of T cell activation in space.

Inhibition of T cell proliferation could also result from alterations in the downstream signaling events [102]. PKA and PKC are key regulators of T cell activation [111]. The cytoskeleton is involved in signal transduction [110] and has been described as the structure through which cells sense gravity [112]. An association between the cytoskeleton and PKC exists [113]. A disorganization of the cytoskeleton [99, 109, 114–116] could therefore result in a disturbed localization of signaling molecules. This hypothesis was confirmed by the analysis of the distribution of PKC isoforms, which was shown to be altered in monocytes and lymphocytes exposed to low gravity [117–119]. However, a recent study indicated that the phosphorylation of PKC was not down-regulated in T cells incubated with Con A and anti-CD28 under microgravity [104]. Furthermore, although some studies suggested that there may be a microgravity-induced PKC defect [117, 120, 121], Cooper and Pellis [107] were able to fully activate T cells to proliferate under simulated microgravity with PMA and ionomycin, suggesting that it is the signaling pathways upstream of PKC activation that are sensitive to simulated microgravity. Hughes-Fulford's group analyzed differential gene expression in Con A and anti-CD28 activated human T cells [104] and discovered that the impaired induction of early genes regulated primarily by transcription factors NF-κB, CREB, Ets-like protein, AP-1, and STAT1 contributes to T cell dysfunction under altered gravity. They also showed that the PKA pathway is down-regulated under microgravity. As NF-κB, AP-1, and CREB are regulated by PKA, these findings indicate that PKA is a key player in gravity-mediated modulation of T cell activation. As the absence of gravity has a negative impact on signaling pathways essential for early T cell activation [111], it is not surprising that the expression of downstream targets, such as genes involved in proliferation, apoptosis, biosynthesis, and secretion, is affected by microgravity.

Cytokine data were reported recently for crew members on short- and long-duration missions on the ISS [55]. Both groups had a low secreted IFN-γ:IL-10 ratio on the day of landing after activation of peripheral blood T cells with anti-CD3 and anti-CD28. Another study performed on PHA-stimulated splenocytes of mice flown on STS-108 revealed that IL-2 and IFN-γ were significantly lower after the flight [35]. IFN-γ depresses TH2 cell activity [122, 123], and a low IFN-γ:IL-10 ratio indicates a shift toward the TH2 subset [124]. Thus, a TH2 cytokine shift is associated with spaceflight. Another cytokine study reported that mice flown on STS-118 had a significantly higher IFN-γ:IL-10 ratio compared with control mice [56], suggesting a shift away from TH2 cells. However, cells other than TH1 and TH2 cells in the splenocyte mixture studied by these authors could have contributed to the levels for both cytokines. If a TH2 shift persists during long missions, it could represent a significant clinical risk for TH2-related autoimmune diseases, allergies, hypersensitivities, and disease susceptibility related to diminished cell-mediated immunity.

Finally, we should not forget that space radiation affects T cells. For example, the thymuses from mice flown on STS-118 were used to evaluate the expression of cancer-related genes, as thymic lymphoma is a common finding after radiation exposure [125]. The expression of 30 of the 84 evaluated genes involved in cell transformation and tumorigenesis was modified significantly, shortly after return from the spaceflight environment [56].

HUMORAL IMMUNITY

By comparison with natural immunity and T cell responses, our knowledge of the spaceflight-induced alterations of the humoral immune system is less developed. Studies about the levels of Ig in the plasma did not reveal significant changes after short spaceflights [44, 54, 126]. Different results were reported after long-duration missions: Konstantinova et al. [127] reported increased levels of serum Ig, particularly total IgA and IgG, and Rykova et al. [54] indicated that the total amounts of serum IgA, IgG, and IgM were unchanged after prolonged missions.

Studies about the effects of spaceflight on the antibody responses to specific antigens are rare. The only pieces of work addressing this question have been published recently [54, 128, 129]. In 2008, Rykova et al. [54] quantified IgM and IgG antibodies to HSV, CMV, EBV, and herpes virus type 6 in plasma samples from 30 cosmonauts who flew in the ISS to determine the effects of spaceflight on viral-specific humoral responses. No significant changes were found in the antiviral antibody levels determined by ELISA after long and short spaceflights compared with the pre-launch values. Unfortunately, that study did not provide information about potential reactivation of these latent viruses in the analyzed individuals. To determine if the humoral response is affected by spaceflight conditions, our team performed the Genesis experiment

during the Perseus space mission. Adult *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) remained in the Mir space station for 5 months and were immunized with protein. These are the only animals to have been immunized in space and are among the few vertebrates that have lived onboard a space station for an extended period of time. The quantification of IgY (the physiological counterpart of human IgA) [130] and IgM heavy chain mRNA in the spleen of animals sacrificed 10 days after landing showed that the IgY, but not the IgM, expression is increased in flown animals, which supports previous data published by Konstantinova et al. [127]. To better understand spaceflight-induced modifications of the humoral response, we determined how these animals used their families of VH genes to build specific antibodies in response to the antigenic challenge. We focused our attention on IgM, as this isotype represents 75% of the antibodies in *P. waltl* [130]. These studies indicated that genes belonging to the VHII and VHVI families encode variable domains of specific IgM heavy chains produced by immunized animals [128]. However, the VHII and VHVI families were found in 28% and 58% of IgM heavy chains from animals immunized on Earth and in 61% and 24% of IgM heavy chains from animals immunized onboard Mir, respectively. Then, we determined how these animals used their individual VHII and VHVI genes. The experiments revealed an increase in the expression of IgM heavy chain mRNAs encoded by the VHII and VHVI.C genes and a strong decrease in IgM heavy chain mRNAs encoded by the VHVI.A and VHVI.B genes in spaceflight animals. Thus, different heavy chain mRNAs were expressed by spaceflight animals, demonstrating that this environment affects the humoral immune response [129].

ELISA tests performed under microgravity, 0.38 G (the martian gravity), 1 G, and 1.8 G, indicated that antibody binding does not depend on gravity [131]. The same conclusion was reached when the linkage between Con A and the TCR was studied (see T Cells in Low-Gravity Conditions section). Thus, ligand-receptor interactions appear unaffected by spaceflight conditions and are not responsible for immune depression.

It should be noted that radiation encountered during space missions may also affect the humoral response, as significant decreases in IgG1, IgG2a, and IgG2b in mice exposed to chronic low-dose γ-irradiation have been reported [132]. Furthermore, it was shown that solar-equivalent proton radiation induced an acute and severe depression of B cells and specific antibody formation [133, 134].

Finally, a differential sensitivity of the cellular and humoral immune systems to spaceflight conditions seems to exist, as it was shown that the cellular, but not the humoral, responses are affected by short periods of time in flight [44, 54, 126, 135]. Modifications of the humoral responses were only observed after long-term flights [127–129]. A spaceflight-induced modification in the expression of cytokines may contribute to this differential sensitivity. Indeed, as indicated in T Cells in Low-Gravity section, a TH2 cytokine shift is associated with spaceflights, and it has been demonstrated that if naïve $CD4^+$ T cells react to type 1 signals, such as IFN-γ and IL-12, they differentiate into IFN-γ-secreting TH1 cells to fight intracellular pathogens, or alternatively, in the presence of IL-4, they differentiate into TH2 cells whose main function is to promote humoral and antihelminth immunity [136].

COUNTERMEASURES

Several countermeasures have been tested to prevent compromises in resistance to infection resulting from exposure to spaceflight conditions. The three most promising countermeasures are presented below.

Increased oxidative stress, which is harmful for cells and can induce many disorders, has been observed after radiation exposure and is associated with spaceflight [137, 138]. Indeed, it was shown that the urinary concentration of 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (a marker of oxidative damage to DNA) was higher and that RBC superoxide dismutase (an antioxidant enzyme) was lower after a long-duration spaceflight [139]. Many molecules have antioxidant properties. Among these molecules, two investigations (one in vitro and one in vivo) showed that *N*-acetyl cysteine, ascorbic acid, α-lipoic acid, L-selenomethionine, coenzyme Q10, and vitamin E succinate are effective in protecting against space radiation-induced oxidative stress, and a complete or nearly complete protection was achieved by treating cells or mice with a combination of these agents [140, 141]. The addition of D-selenomethionine in the food of rats also prevented the decrease in total antioxidants associated with high-energy charged-particle irradiation by regulating the expression of genes involved in the repair of radiation-induced DNA damage [142]. These data indicate that antioxidants, alone or in combination, are likely promising countermeasures for protection against space radiation-induced adverse biologic effects.

During spaceflight, crews have altered dietary intake [143]. In addition, nutrient absorption and metabolism appear altered under spaceflight conditions. A well-known example is calcium metabolism. A decrease of up to 50% in calcium absorption and an increase of up to 50% of its excretion were observed in three crew members, who spent 115 days onboard the Mir space station [144]. As it is clearly established that energy and nutrient intake have profound effects on immune function [145], dietary countermeasures have been developed. Several studies have analyzed the effects of supplemental dietary nucleotides on immune function using ground-based models of microgravity. Hales et al. [146] have shown that decreased proliferation of splenocytes in response to PHA under simulated microgravity can be restored by supplementation with uridine, but not inosine, indicating that pyrimidines are more effective. This in vitro study also revealed that splenocytes secreted more IL-1β, IL-2, and IFN-γ when cultured in the presence of a nucleoside-nucleotide mixture. In vivo studies confirmed these results by showing that RNA and uracil diets could restore IL-2 and IFN-γ production, in addition to the proliferation of PHA-stimulated splenocytes from hindlimb-unloaded mice [147, 148]. Thus, supplemental nucleotides, especially uracil/uridine, possess immunoprotective effects and enhance immune function; these supplements are potential countermeasures for the observed immune dysfunction associated with space travel.

Another interesting compound is AHCC, which is an extract prepared from cocultured mycelia of several species of *Basidiomycete* mushrooms that contain polysaccharides (74%), amino acids, and minerals. This product has been shown to have a positive effect on the immune system of humans and rodents [149, 150]. Consequently, it was tested on hindlimb-unloaded mice that have decreased resistance to bacterial infections [20, 151]. Aviles et al. [151] showed that oral administration of AHCC for 1 week before suspension and throughout the 10-day suspension period enhanced the resistance to *K. pneumoniae* infection. The same team demonstrated that AHCC increased the TH1 response significantly in Con A-stimulated splenocytes from hindlimb-unloaded mice [152]. This compound also restored the functions of peritoneal cells that are suppressed by hindlimb unloading and increased NO production in peritoneal cells isolated from hindlimb-unloaded mice. Other studies showed that AHCC enhanced resistance to infection in a mouse model of surgical wound infection and activated immune function to decrease the bacterial load in a murine model of intramuscular infection [153, 154]. Thus, it appears that AHCC restores innate immunity, which is greatly affected by hindlimb unloading, and represents another countermeasure with great potential.

Other tested strategies include, for example, the injection of pegylated IL-2, a molecule that has been shown to increase the absolute number and activity of NK cells, T cells, and monocytes in humans and animals. However, studies performed on rats subjected to two 8-day spaceflights did not produce any reliable conclusions about the effects of this molecule, as there were notable differences between some of the data obtained from each flight [40]. Recently, it has been shown that muscular exercise has a positive impact on antibody production. Indeed, Shearer et al. [155] reported that the rate of primary antibody production increased at a faster rate and to a higher level in women subjected to HDBR plus exercise than in ones subjected to HDBR-only or HDBR plus protein supplementation.

These data indicate that the addition of antioxidants, nucleotides, or AHCC in the food could prevent alterations of the immune system under spaceflight conditions but also under any other conditions where the function of the immune system is compromised on Earth.

CONCLUSION

Spaceflight is a unique stress model impacted consistently or intermittently by myriad stresses, including psychosocial and physical stresses, high G forces at the time of launch and landing, increased radiation, sleep deprivation, microgravity, and nutritional factors. This multitude of factors alters the immune system and could lead to compromised defenses against infections and tumors. Over the past two to three decades, there have been a large number of investigations of space effects on the immune system. Unfortunately, many variable results have been reported, which is likely a result of individuals who react differently to stressful situations, the low number of subjects, and the different characteristics of each space mission. Despite this variability, it is obvious that spaceflight has profound immunosuppressive effects on humans and animals. An 18-month trip to Mars will, without any doubt, multiply the hazards of space travel. However, our current knowledge about the effects of extended spaceflights on the immune system is restricted for the following reasons: Only few astronauts and animals have spent several months continuously in space (the current record holders are Valery Polyakov and Sunita Williams, who spent 438 and 195 days in space, respectively); the effects of solar and cosmic radiation on the immune system are unknown, and neither the moon nor Mars has magnetic fields or dense atmospheres that could attenuate them; and only 24 astronauts have been beyond the low-Earth orbit. It is therefore wise to foster research to advance scientific comprehension of the hazards that are present as humans explore space and to investigate the effectiveness of various potential countermeasures to combat the deleterious effects of spaceflight. Additionally, findings from these researches could have substantial applications on Earth to counter immune dysfunction.

AUTHORSHIP

Each author was in charge of one chapter of this review. Moreover, J.-P. F. coordinated and supervised the work.

ACKNOWLEDGMENTS

Our team has been funded by CNES, ESA, the French Ministry of Higher Education and Research, Nancy-University, the Lorraine Region, and the University of Luxembourg. M. B. is supported by the French Ministry of Higher Education and Research, and N. G. and C. H.-S. are supported by the National Research Fund of Luxembourg. We thank the astronauts who performed our space experiments as well as the CNES and the ESA boards for management. We are also grateful to our Russian colleagues for their help in the preparation and the realization of the experiments.

REFERENCES

1. Brumfiel, G. (2007) Space exploration: where 24 men have gone before. *Nature* **445,** 474–478.
2. Heppener, M. (2008) Spaceward ho! The future of humans in space. *EMBO Rep.* **9** (Suppl. 1), S4–S12.
3. White, R. J. (1998) Weightlessness and the human body. *Sci. Am.* **279,** 58–63.
4. Pierson, D. L., Chidambaram, M., Heath, J. D., Mallary, L., Mishra, S. K., Sharma, B., Weinstock, G. M. (1996) Epidemiology of *Staphylococcus aureus* during space flight. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16,** 273–281.
5. Pierson, D. L., Mehta, S. K., Magee, B. B., Mishra, S. K. (1995) Person-to-person transfer of *Candida albicans* in the spacecraft environment. *J. Med. Vet. Mycol.* **33,** 145–150.
6. Kimzey, S. L. (1977) Hematology and immunology studies. In *Biomedical Results from Skylab* (R. S. Johnson, L. F. Dietlein, eds.), Washington, DC, USA, NASA, 248–282.
7. Ball, J. R., Evans Jr., C. H. (2001) Safe passage: astronaut care for exploration missions. In *Committee on Creating a Vision for Space Medicine During Travel Beyond Earth Orbit, Board on Health Sciences Policy,* Washington, DC, USA, National Academy.
8. Decelle, J. G., Taylor, G. R. (1976) Autoflora in the upper respiratory tract of Apollo astronauts. *Appl. Environ. Microbiol.* **32,** 659–665.
9. Pierson, D. L. (2001) Microbial contamination of spacecraft. *Gravit. Space Biol. Bull.* **14,** 1–6.

10. Ilyin, V. K. (2005) Microbiological status of cosmonauts during orbital spaceflights on Salyut and Mir orbital stations. *Acta Astronaut.* **56,** 839–850.
11. Berry, C. A. (1970) Summary of medical experience in the Apollo 7 through 11 manned spaceflights. *Aerosp. Med.* **41,** 500–519.
12. Puleo, J. R., Oxborrow, G. S., Fields, N. D., Herring, C. M., Smith, L. S. (1973) Microbiological profiles of four Apollo spacecraft. *Appl. Microbiol.* **26,** 838–845.
13. Novikova, N. D. (2004) Review of the knowledge of microbial contamination of the Russian manned spacecraft. *Microb. Ecol.* **47,** 127–132.
14. La Duc, M. T., Dekas, A., Osman, S., Moissl, C., Newcombe, D., Venkateswaran, K. (2007) Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **73,** 2600–2611.
15. Taylor, G. R. (1974) Space microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **28,** 121–137.
16. Hammond, T. G., Benes, E., O'Reilly, K. C., Wolf, D. A., Linnehan, R. M., Taher, A., Kaysen, J. H., Allen, P. L., Goodwin, T. J. (2000) Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle. *Physiol. Genomics* **3,** 163–173.
17. Collister, M., Didmon, M. P., MacIsaac, F., Stark, M. J., MacDonald, N. Q., Keyse, S. M. (2002) YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.* **527,** 186–192.
18. Kinney, K. S., Austin, C. E., Morton, D. S., Sonnenfeld, G. (2000) Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacteria—mechanistic studies. *Life Sci.* **67,** 3075–3085.
19. Belay, T., Aviles, H., Vance, M., Fountain, K., Sonnenfeld, G. (2003) Catecholamines and in vitro growth of pathogenic bacteria: enhancement of growth varies greatly among bacterial species. *Life Sci.* **73,** 1527–1535.
20. Belay, T., Sonnenfeld, G. (2002) Differential effects of catecholamines on in vitro growth of pathogenic bacteria. *Life Sci.* **71,** 447–456.
21. Sonnenfeld, G. (1999) Space flight, microgravity, stress, and immune responses. *Adv. Space Res.* **23,** 1945–1953.
22. Leys, N. M., Hendrickx, L., De Boever, P., Baatout, S., Mergeay, M. (2004) Space flight effects on bacterial physiology. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **18,** 193–199.
23. Juergensmeyer, M. A., Juergensmeyer, E. A., Guikema, J. A. (1999) Long-term exposure to spaceflight conditions affects bacterial response to antibiotics. *Microgravity Sci. Technol.* **12,** 41–47.
24. Tixador, R., Gasset, G., Eche, B., Moatti, N., Lapchine, L., Woldringh, C., Toorop, P., Moatti, J. P., Delmotte, F., Tap, G. (1994) Behavior of bacteria and antibiotics under space conditions. *Aviat. Space Environ. Med.* **65,** 551–556.
25. Graebe, A., Schuck, E. L., Lensing, P., Putcha, L., Derendorf, H. (2004) Physiological, pharmacokinetic, and pharmacodynamic changes in space. *J. Clin. Pharmacol.* **44,** 837–853.
26. Fukuda, T., Fukuda, K., Takahashi, A., Ohnishi, T., Nakano, T., Sato, M., Gunge, N. (2000) Analysis of deletion mutations of the rpsL gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* detected after long-term flight on the Russian space station Mir. *Mutat. Res.* **470,** 125–132.
27. Chopra, V., Fadl, A. A., Sha, J., Chopra, S., Galindo, C. L., Chopra, A. K. (2006) Alterations in the virulence potential of enteric pathogens and bacterial-host cell interactions under simulated microgravity conditions. *J. Toxicol. Environ. Health A* **69,** 1345–1370.
28. Altenburg, S. D., Nielsen-Preiss, S. M., Hyman, L. E. (2008) Increased filamentous growth of *Candida albicans* in simulated microgravity. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **6,** 42–50.
29. Luckey, T. D., Bengson, M. H., Kaplan, H. (1974) Effect of bioisolation and the intestinal flora of mice upon evaluation of an Apollo diet. *Aerosp. Med.* **45,** 509–518.
30. Nickerson, C. A., Ott, C. M., Mister, S. J., Morrow, B. J., Burns-Keliher, L., Pierson, D. L. (2000) Microgravity as a novel environmental signal affecting *Salmonella enterica serovar Typhimurium* virulence. *Infect. Immun.* **68,** 3147–3152.
31. Wilson, J. W., Ramamurthy, R., Porwollik, S., McClelland, M., Hammond, T., Allen, P., Ott, C. M., Pierson, D. L., Nickerson, C. A. (2002) Microarray analysis identifies Salmonella genes belonging to the low-shear modeled microgravity regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99,** 13807–13812.
32. Wilson, J. W., Ott, C. M., Höner zu Bentrup, K., Ramamurthy, R., Quick, L., Porwollik, S., Cheng, P., McClelland, M., Tsaprailis, G., Radabaugh, T., et al. (2007) Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104,** 16299–16304.
33. Meibom, K. L., Forslund, A. L., Kuoppa, K., Alkhuder, K., Dubail, I., Dupuis, M., Forsberg, A., Charbit, A. (2009) Hfq, a novel pleiotropic regulator of virulence-associated genes in *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* **77,** 1866–1880.
34. Durnova, G. N., Kaplansky, A. S., Portugalov, V. V. (1976) Effect of a 22-day space flight on the lymphoid organs of rats. *Aviat. Space Environ. Med.* **47,** 588–591.
35. Gridley, D. S., Nelson, G. A., Peters, L. L., Kostenuik, P. J., Bateman, T. A., Morony, S., Stodieck, L. S., Lacey, D. L., Simske, S. J., Pecaut, M. J. (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. II. Activation, cytokines, erythrocytes, and platelets. *J. Appl. Physiol.* **94,** 2095–2103.
36. Baqai, F. P., Gridley, D. S., Slater, J. M., Luo-Owen, X., Stodieck, L. S., Ferguson, V. L., Chapes, S. K., Pecaut, M. J. (2009) Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *J. Appl. Physiol.* **106,** 1935–1942.
37. Steffen, J. M., Musacchia, X. J. (1986) Thymic involution in the suspended rat: adrenal hypertrophy and glucocorticoid receptor content. *Aviat. Space Environ. Med.* **57,** 162–167.
38. Pecaut, M. J., Simske, S. J., Fleshner, M. (2000) Spaceflight induces changes in splenocyte subpopulations: effectiveness of ground-based models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279,** R2072–R2078.
39. Chapes, S. K., Simske, S. J., Forsman, A. D., Bateman, T. A., Zimmerman, R. J. (1999) Effects of space flight and IGF-1 on immune function. *Adv. Space Res.* **23,** 1955–1964.
40. Chapes, S. K., Simske, S. J., Sonnenfeld, G., Miller, E. S., Zimmerman, R. J. (1999) Effects of spaceflight and PEG-IL-2 on rat physiological and immunological responses. *J. Appl. Physiol.* **86,** 2065–2076.
41. Congdon, C. C., Allebban, Z., Gibson, L. A., Kaplansky, A., Strickland, K. M., Jago, T. L., Johnson, D. L., Lange, R. D., Ichiki, A. T. (1996) Lymphatic tissue changes in rats flown on Spacelab Life Sciences-2. *J. Appl. Physiol.* **81,** 172–177.
42. Gould, C. L., Lyte, M., Williams, J., Mandel, A. D., Sonnenfeld, G. (1987) Inhibited interferon-γ but normal interleukin-3 production from rats flown on the space shuttle. *Aviat. Space Environ. Med.* **58,** 983–986.
43. Grove, D. S., Pishak, S. A., Mastro, A. M. (1995) The effect of a 10-day space flight on the function, phenotype, and adhesion molecule expression of splenocytes and lymph node lymphocytes. *Exp. Cell Res.* **219,** 102–109.
44. Stowe, R. P., Sams, C. F., Mehta, S. K., Kaur, I., Jones, M. L., Feeback, D. L., Pierson, D. L. (1999) Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* **65,** 179–186.
45. Vernikos, J. (1996) Human physiology in space. *Bioessays* **18,** 1029–1037.
46. Taylor, G. R., Neale, L. S., Dardano, J. R. (1986) Immunological analyses of U.S. Space Shuttle crewmembers. *Aviat. Space Environ. Med.* **57,** 213–217.
47. Sonnenfeld, G., Mandel, A. D., Konstantinova, I. V., Berry, W. D., Taylor, G. R., Lesnyak, A. T., Fuchs, B. B., Rakhmilevich, A. L. (1992) Spaceflight alters immune cell function and distribution. *J. Appl. Physiol.* **73,** 191S–195S.
48. Allebban, Z., Ichiki, A. T., Gibson, L. A., Jones, J. B., Congdon, C. C., Lange, R. D. (1994) Effects of spaceflight on the number of rat peripheral blood leukocytes and lymphocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.* **55,** 209–213.
49. Ichiki, A. T., Gibson, L. A., Jago, T. L., Strickland, K. M., Johnson, D. L., Lange, R. D., Allebban, Z. (1996) Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.* **60,** 37–43.
50. Crucian, B. E., Cubbage, M. L., Sams, C. F. (2000) Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. *J. Interferon Cytokine Res.* **20,** 547–556.
51. Mills, P. J., Meck, J. V., Waters, W. W., D'Aunno, D., Ziegler, M. G. (2001) Peripheral leukocyte subpopulations and catecholamine levels in astronauts as a function of mission duration. *Psychosom. Med.* **63,** 886–890.
52. Pecaut, M. J., Nelson, G. A., Peters, L. L., Kostenuik, P. J., Bateman, T. A., Morony, S., Stodieck, L. S., Lacey, D. L., Simske, S. J., Gridley, D. S. (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. I. Immune population distributions. *J. Appl. Physiol.* **94,** 2085–2094.
53. Stowe, R. P., Sams, C. F., Pierson, D. L. (2003) Effects of mission duration on neuroimmune responses in astronauts. *Aviat. Space Environ. Med.* **74,** 1281–1284.
54. Rykova, M. P., Antropova, E. N., Larina, I. M., Morukov, B. V. (2008) Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. *Acta Astraunautica* **63,** 697–705.
55. Crucian, B. E., Stowe, R. P., Pierson, D. L., Sams, C. F. (2008) Immune system dysregulation following short- vs. long-duration spaceflight. *Aviat. Space Environ. Med.* **79,** 835–843.
56. Gridley, D. S., Slater, J. M., Luo-Owen, X., Rizvi, A., Chapes, S. K., Stodieck, L. S., Ferguson, V. L., Pecaut, M. J. (2009) Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J. Appl. Physiol.* **106,** 194–202.
57. Kaur, I., Simons, E. R., Castro, V. A., Mark Ott, C., Pierson, D. L. (2004) Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain Behav. Immun.* **18,** 443–450.
58. Kaur, I., Simons, E. R., Castro, V. A., Ott, C. M., Pierson, D. L. (2005) Changes in monocyte functions of astronauts. *Brain Behav. Immun.* **19,** 547–554.
59. Kaur, I., Simons, E. R., Kapadia, A. S., Ott, C. M., Pierson, D. L. (2008) Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.* **15,** 1523–1528.

60. Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Golenbock, D. T. (2004) Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect.* **6,** 1361–1367.
61. Miyake, K. (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.* **12,** 186–192.
62. Rykova, M. P., Sonnenfeld, G., Lesnyak, A. T., Taylor, G. R., Meshkov, D. O., Mandel, A. D., Medvedev, A. E., Berry, W. D., Fuchs, B. B., Konstantinova, I. V. (1992) Effect of spaceflight on natural killer cell activity. *J. Appl. Physiol.* **73,** 196S–200S.
63. Taylor, G. R., Janney, R. P. (1992) In vivo testing confirms a blunting of the human cell-mediated immune mechanism during space flight. *J. Leukoc. Biol.* **51,** 129–132.
64. Lesnyak, A., Sonnenfeld, G., Avery, L., Konstantinova, I., Rykova, M., Meshkov, D., Orlova, T. (1996) Effect of SLS-2 spaceflight on immunologic parameters of rats. *J. Appl. Physiol.* **81,** 178–182.
65. Konstantinova, I. V., Rykova, M., Meshkov, D., Peres, C., Husson, D., Schmitt, D. A. (1995) Natural killer cells after ALTAIR mission. *Acta Astronaut.* **36,** 713–718.
66. Meshkov, D., Rykova, M. (1995) The natural cytotoxicity in cosmonauts on board space stations. *Acta Astronaut.* **36,** 719–726.
67. Mehta, S. K., Kaur, I., Grimm, E. A., Smid, C., Feeback, D. L., Pierson, D. L. (2001) Decreased non-MHC-restricted (CD56+) killer cell cytotoxicity after spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **91,** 1814–1818.
68. Armstrong, J. W., Kirby-Dobbels, K., Chapes, S. K. (1995) The effects of rM-CSF and rIL-6 therapy on immunosuppressed antiorthostatically suspended mice. *J. Appl. Physiol.* **78,** 968–975.
69. Dunn, C. D., Johnson, P. C., Lange, R. D., Perez, L., Nessel, R. (1985) Regulation of hematopoiesis in rats exposed to antiorthostatic, hypokinetic/hypodynamia: I. Model description. *Aviat. Space Environ. Med.* **56,** 419–426.
70. Ortega, M. T., Pecaut, M. J., Gridley, D. S., Stodieck, L. S., Ferguson, V., Chapes, S. K. (2009) Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **106,** 548–555.
71. Sonnenfeld, G. (1994) Effect of space flight on cytokine production. *Acta Astronaut.* **33,** 143–147.
72. Lesnyak, A. T., Sonnenfeld, G., Rykova, M. P., Meshkov, D. O., Mastro, A., Konstantinova, I. (1993) Immune changes in test animals during spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* **54,** 214–226.
73. Talas, M., Batkai, L., Stoger, I., Nagy, K., Hiros, L., Konstantinova, I., Rykova, M., Mozgovaya, I., Guseva, O., Kozharinov, V. (1984) Results of space experiment program "Interferon". *Acta Astronaut.* **11,** 379–386.
74. Fleming, S. D., Edelman, L. S., Chapes, S. K. (1991) Effects of corticosterone and microgravity on inflammatory cell production of superoxide. *J. Leukoc. Biol.* **50,** 69–76.
75. Mehta, S. K., Stowe, R. P., Feiveson, A. H., Tyring, S. K., Pierson, D. L. (2000) Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. *J. Infect. Dis.* **182,** 1761–1764.
76. Stowe, R. P., Mehta, S. K., Ferrando, A. A., Feeback, D. L., Pierson, D. L. (2001) Immune responses and latent herpesvirus reactivation in spaceflight. *Aviat. Space Environ. Med.* **72,** 884–891.
77. Stowe, R. P., Pierson, D. L., Barrett, A. D. (2001) Elevated stress hormone levels relate to Epstein-Barr virus reactivation in astronauts. *Psychosom. Med.* **63,** 891–895.
78. Pierson, D. L., Stowe, R. P., Phillips, T. M., Lugg, D. J., Mehta, S. K. (2005) Epstein-Barr virus shedding by astronauts during space flight. *Brain Behav. Immun.* **19,** 235–242.
79. Cohrs, R. J., Mehta, S. K., Schmid, D. S., Gilden, D. H., Pierson, D. L. (2008) Asymptomatic reactivation and shed of infectious varicella zoster virus in astronauts. *J. Med. Virol.* **80,** 1116–1122.
80. Gould, C. L., Sonnenfeld, G. (1987) Enhancement of viral pathogenesis in mice maintained in an antiorthostatic suspension model: coordination with effects on interferon production. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **1,** 33–36.
81. Aviles, H., Belay, T., Fountain, K., Vance, M., Sonnenfeld, G. (2003) Increased susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infection under hindlimb-unloading conditions. *J. Appl. Physiol.* **95,** 73–80.
82. Aviles, H., Belay, T., Vance, M., Sonnenfeld, G. (2005) Effects of space flight conditions on the function of the immune system and catecholamine production simulated in a rodent model of hindlimb unloading. *Neuroimmunomodulation* **12,** 173–181.
83. O'Donnell, P. M., Orshal, J. M., Sen, D., Sonnenfeld, G., Aviles, H. O. (2009) Effects of exposure of mice to hindlimb unloading on leukocyte subsets and sympathetic nervous system activity. *Stress* **12,** 82–88.
84. Tipton, C. M., Greenleaf, J. E., Jackson, C. G. (1996) Neuroendocrine and immune system responses with spaceflights. *Med. Sci. Sports Exerc.* **28,** 988–998.
85. Meehan, R., Whitson, P., Sams, C. (1993) The role of psychoneuroendocrine factors on spaceflight-induced immunological alterations. *J. Leukoc. Biol.* **54,** 236–244.
86. Abrass, C. K., O'Connor, S. W., Scarpace, P. J., Abrass, I. B. (1985) Characterization of the β-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J. Immunol.* **135,** 1338–1341.
87. Liggett, S. B. (1989) Identification and characterization of a homogeneous population of β 2-adrenergic receptors on human alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139,** 552–555.
88. Miura, T., Kudo, T., Matsuki, A., Sekikawa, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Nakane, A. (2001) Effect of 6-hydroxydopamine on host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* **69,** 7234–7241.
89. Boomershine, C. S., Lafuse, W. P., Zwilling, B. S. (1999) β2-Adrenergic receptor stimulation inhibits nitric oxide generation by *Mycobacterium avium* infected macrophages. *J. Neuroimmunol.* **101,** 68–75.
90. Konstantinova, I. V., Antropova, Y. N., Legenkov, V. I., Zazhirey, V. D. (1973) Study of the reactivity of blood lymphoid cells in crew members of the Soyuz-6, 7 and 8 spaceships before and after flight. *Kosm. Biol. Med.*, 35–40.
91. Nash, P. V., Mastro, A. M. (1992) Variable lymphocyte responses in rats after space flight. *Exp. Cell Res.* **202,** 125–131.
92. Chapes, S. K. (2004) Lessons from Immune 1–3: what did we learn and what do we need to do in the future? *J. Gravit. Physiol.* **11,** P45–P48.
93. Sonnenfeld, G., Foster, M., Morton, D., Bailliard, F., Fowler, N. A., Hakenewerth, A. M., Bates, R., Miller Jr., E. S. (1998) Spaceflight and development of immune responses. *J. Appl. Physiol.* **85,** 1429–1433.
94. Cogoli, A., Tschopp, A., Fuchs-Bislin, P. (1984) Cell sensitivity to gravity. *Science* **225,** 228–230.
95. Bechler, B., Cogoli, A., Mesland, D. (1986) [Lymphocytes are sensitive to gravity]. *Naturwissenschaften* **73,** 400–403.
96. Cogoli, A., Bechler, B., Cogoli-Greuter, M., Criswell, S. B., Joller, H., Joller, P., Hunzinger, E., Muller, O. (1993) Mitogenic signal transduction in T lymphocytes in microgravity. *J. Leukoc. Biol.* **53,** 569–575.
97. Pippia, P., Sciola, L., Cogoli-Greuter, M., Meloni, M. A., Spano, A., Cogoli, A. (1996) Activation signals of T lymphocytes in microgravity. *J. Biotechnol.* **47,** 215–222.
98. Cogoli, M., Bechler, B., Cogoli, A., Arena, N., Barni, S., Pippia, P., Sechi, G., Valora, N., Monti, R. (1992) Lymphocytes on sounding rockets. *Adv. Space Res.* **12,** 141–144.
99. Cogoli-Greuter, M., Spano, A., Sciola, L., Pippia, P., Cogoli, A. (1998) Influence of microgravity on mitogen binding, motility and cytoskeleton patterns of T lymphocytes and Jurkat cells-experiments on sounding rockets. *Japanese Journal of Aerospace and Environmental Medicine* **35,** 27–39.
100. Cogoli-Greuter, M., Lovis, P., Vadrucci, S. (2004) Signal transduction in T cells: an overview. *J. Gravit. Physiol.* **11,** P53–P56.
101. Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., Taniguchi, T. (1993) The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* **11,** 245–268.
102. Hashemi, B. B., Penkala, J. E., Vens, C., Huls, H., Cubbage, M., Sams, C. F. (1999) T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and in spaceflight. *FASEB J.* **13,** 2071–2082.
103. Walther, I., Pippia, P., Meloni, M. A., Turrini, F., Mannu, F., Cogoli, A. (1998) Simulated microgravity inhibits the genetic expression of interleukin-2 and its receptor in mitogen-activated T lymphocytes. *FEBS Lett.* **436,** 115–118.
104. Boonyaratanakornkit, J. B., Cogoli, A., Li, C. F., Schopper, T., Pippia, P., Galleri, G., Meloni, M. A., Hughes-Fulford, M. (2005) Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J.* **19,** 2020–2022.
105. Negri, R., Costanzo, G., Galleri, G., Meloni, M. A., Pippia, P., Schopper, T., Cogoli-Greuter, M. (2003) Early transcriptional response of human T-lymphocytes to microgravity conditions during MASER 9 vector flight. In *Proceedings of the 16th ESA Symposium on European Rocket and Ballon Programmes and Related Research* (B. Warmbein, ed.), St. Gallen, Switzerland, ESA SP-530, 243–247.
106. Cogoli, A. (1993) The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system. *J. Leukoc. Biol.* **54,** 259–268.
107. Cooper, D., Pellis, N. R. (1998) Suppressed PHA activation of T lymphocytes in simulated microgravity is restored by direct activation of protein kinase C. *J. Leukoc. Biol.* **63,** 550–562.
108. Cogoli-Greuter, M., Meloni, M. A., Sciola, L., Spano, A., Pippia, P., Monaco, G., Cogoli, A. (1996) Movements and interactions of leukocytes in microgravity. *J. Biotechnol.* **47,** 279–287.
109. Meloni, M. A., Galleri, G., Pippia, P., Cogoli-Greuter, M. (2006) Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modeled low gravity. *Protoplasma* **229,** 243–249.
110. Janmey, P. A. (1998) The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* **78,** 763–781.
111. Hughes-Fulford, M., Sugano, E., Schopper, T., Li, C. F., Boonyaratanakornkit, J. B., Cogoli, A. (2005) Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits. *Cell. Signal.* **17,** 1111–1124.
112. Ingber, D. (1999) How cells (might) sense microgravity. *FASEB J.* **13** (Suppl.), S3–S15.
113. Gregorio, C. C., Repasky, E. A., Fowler, V. M., Black, J. D. (1994) Dynamic properties of ankyrin in T lymphocytes: colocalization with spectrin and protein kinase C β. *J. Cell Biol.* **125,** 345–358.
114. Lewis, M. L., Reynolds, J. L., Cubano, L. A., Hatton, J. P., Lawless, B. D., Piepmeier, E. H. (1998) Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J.* **12,** 1007–1018.
115. Lewis, M. L., Cubano, L. A., Zhao, B., Dinh, H. K., Pabalan, J. G., Piepmeier, E. H., Bowman, P. D. (2001) cDNA microarray reveals altered cytoskeletal gene expression in space-flown leukemic T lymphocytes (Jurkat). *FASEB J.* **15,** 1783–1785.
116. Hughes-Fulford, M. (2003) Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. *Adv. Space Res.* **32,** 1585–1593.

117. Schmitt, D. A., Hatton, J. P., Emond, C., Chaput, D., Paris, H., Levade, T., Cazenave, J. P., Schaffar, L. (1996) The distribution of protein kinase C in human leukocytes is altered in microgravity. *FASEB J.* **10,** 1627–1634.
118. Hatton, J. P., Gaubert, F., Lewis, M. L., Darsel, Y., Ohlmann, P., Cazenave, J. P., Schmitt, D. (1999) The kinetics of translocation and cellular quantity of protein kinase C in human leukocytes are modified during spaceflight. *FASEB J.* **13** (Suppl.), S23–S33.
119. Hatton, J. P., Gaubert, F., Cazenave, J. P., Schmitt, D. (2002) Microgravity modifies protein kinase C isoform translocation in the human monocytic cell line U937 and human peripheral blood T-cells. *J. Cell. Biochem.* **87,** 39–50.
120. De Groot, R. P., Rijken, P. J., den Hertog, J., Boonstra, J., Verkleij, A. J., de Laat, S. W., Kruijer, W. (1991) Nuclear responses to protein kinase C signal transduction are sensitive to gravity changes. *Exp. Cell Res.* **197,** 87–90.
121. Limouse, M., Manie, S., Konstantinova, I., Ferrua, B., Schaffar, L. (1991) Inhibition of phorbol ester-induced cell activation in microgravity. *Exp. Cell Res.* **197,** 82–86.
122. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., Hume, D. A. (2004) Interferon-γ: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75,** 163–189.
123. Young, H. A., Bream, J. H. (2007) IFN-γ: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **316,** 97–117.
124. Zhu, J., Paul, W. E. (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112,** 1557–1569.
125. Boulton, E., Cleary, H., Plumb, M. (2002) Myeloid, B and T lymphoid and mixed lineage thymic lymphomas in the irradiated mouse. *Carcinogenesis* **23,** 1079–1085.
126. Voss Jr., E. W. (1984) Prolonged weightlessness and humoral immunity. *Science* **225,** 214–215.
127. Konstantinova, I. V., Rykova, M. P., Lesnyak, A. T., Antropova, E. A. (1993) Immune changes during long-duration missions. *J. Leukoc. Biol.* **54,** 189–201.
128. Boxio, R., Dournon, C., Frippiat, J. P. (2005) Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl. J. Appl. Physiol.* **98,** 905–910.
129. Bascove, M., Huin-Schohn, C., Gueguinou, N., Tschirhart, E., Frippiat, J. P. (2009) Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl. FASEB J.* **23,** 1607–1615.
130. Schaerlinger, B., Bascove, M., Frippiat, J. P. (2008) A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. *Mol. Immunol.* **45,** 776–786.
131. Maule, J., Fogel, M., Steele, A., Wainwright, N., Pierson, D. L., McKay, D. S. (2003) Antibody binding in altered gravity: implications for immunosorbent assay during space flight. *J. Gravit. Physiol.* **10,** 47–55.
132. Courtade, M., Caratero, A., Jozan, S., Pipy, B., Caratero, C. (2001) Influence of continuous, very low-dose γ-irradiation on the mouse immune system. *Int. J. Radiat. Biol.* **77,** 587–592.
133. Kajioka, E. H., Gheorghe, C., Andres, M. L., Abell, G. A., Folz-Holbeck, J., Slater, J. M., Nelson, G. A., Gridley, D. S. (1999) Effects of proton and γ radiation on lymphocyte populations and acute response to antigen. *In Vivo* **13,** 525–533.
134. Kajioka, E. H., Andres, M. L., Li, J., Mao, X. W., Moyers, M. F., Nelson, G. A., Slater, J. M., Gridley, D. S. (2000) Acute effects of whole-body proton irradiation on the immune system of the mouse. *Radiat. Res.* **153,** 587–594.
135. Sonnenfeld, G., Butel, J. S., Shearer, W. T. (2003) Effects of the space flight environment on the immune system. *Rev. Environ. Health* **18,** 1–17.
136. Abbas, A. K., Murphy, K. M., Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383,** 787–793.
137. Stein, T. P., Leskiw, M. J. (2000) Oxidant damage during and after spaceflight. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278,** E375–E382.
138. Wan, X. S., Bloch, P., Ware, J. H., Zhou, Z., Donahue, J. J., Guan, J., Stewart, J., Kennedy, A. R. (2005) Detection of oxidative stress induced by low- and high-linear energy transfer radiation in cultured human epithelial cells. *Radiat. Res.* **163,** 364–368.
139. Smith, S. M., Zwart, S. R. (2008) Nutrition issues for space exploration. *Acta Astronaut.* **63,** 609–613.
140. Wan, X. S., Ware, J. H., Zhou, Z., Donahue, J. J., Guan, J., Kennedy, A. R. (2006) Protection against radiation-induced oxidative stress in cultured human epithelial cells by treatment with antioxidant agents. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **64,** 1475–1481.
141. Kennedy, A. R., Guan, J., Ware, J. H. (2007) Countermeasures against space radiation induced oxidative stress in mice. *Radiat. Environ. Biophys.* **46,** 201–203.
142. Kennedy, A. R., Ware, J. H., Guan, J., Donahue, J. J., Biaglow, J. E., Zhou, Z., Stewart, J., Vazquez, M., Wan, X. S. (2004) Selenomethionine protects against adverse biological effects induced by space radiation. *Free Radic. Biol. Med.* **36,** 259–266.
143. Lane, H. W., Gretebeck, R. J., Smith, S. M. (1998) Nutrition, endocrinology, and body composition during space flight. *Nutr. Res.* **18,** 1923–1934.
144. Smith, S. M., Wastney, M. E., Morukov, B. V., Larina, I. M., Nyquist, L. E., Abrams, S. A., Taran, E. N., Shih, C. Y., Nillen, J. L., Davis-Street, J. E., Rice, B. L., Lane, H. W. (1999) Calcium metabolism before, during, and after a 3-mo spaceflight: kinetic and biochemical changes. *Am. J. Physiol.* **277,** R1–10.
145. Field, C. J., Johnson, I. R., Schley, P. D. (2002) Nutrients and their role in host resistance to infection. *J. Leukoc. Biol.* **71,** 16–32.
146. Hales, N. W., Yamauchi, K., Alicea, A., Sundaresan, A., Pellis, N. R., Kulkarni, A. D. (2002) A countermeasure to ameliorate immune dysfunction in in vitro simulated microgravity environment: role of cellular-nucleotide nutrition. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **38,** 213–217.
147. Kulkarni, A. D., Yamauchi, K., Hales, N. W., Ramesh, V., Ramesh, G. T., Sundaresan, A., Andrassy, R. J., Pellis, N. R. (2002) Nutrition beyond nutrition: plausibility of immunotrophic nutrition for space travel. *Clin. Nutr.* **21,** 231–238.
148. Yamauchi, K., Hales, N. W., Robinson, S. M., Niehoff, M. L., Ramesh, V., Pellis, N. R., Kulkarni, A. D. (2002) Dietary nucleotides prevent decrease in cellular immunity in ground-based microgravity analog. *J. Appl. Physiol.* **93,** 161–166.
149. Matsui, Y., Uhara, J., Satoi, S., Kaibori, M., Yamada, H., Kitade, H., Imamura, A., Takai, S., Kawaguchi, Y., Kwon, A. H., Kamiyama, Y. (2002) Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study. *J. Hepatol.* **37,** 78–86.
150. Wakame, K. (1999) Protective effects of active hexose correlated compound (AHCC) on the onset of diabetes induced by streptozotocin in the rat. *Biomed. Res.* **20,** 145–152.
151. Aviles, H., Belay, T., Fountain, K., Vance, M., Sun, B., Sonnenfeld, G. (2003) Active hexose correlated compound enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* infection in mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. *J. Appl. Physiol.* **95,** 491–496.
152. Aviles, H., Belay, T., Vance, M., Sun, B., Sonnenfeld, G. (2004) Active hexose correlated compound enhances the immune function of mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. *J. Appl. Physiol.* **97,** 1437–1444.
153. Aviles, H., O'Donnell, P., Sun, B., Sonnenfeld, G. (2006) Active hexose correlated compound (AHCC) enhances resistance to infection in a mouse model of surgical wound infection. *Surg. Infect. (Larchmt)* **7,** 527–535.
154. Aviles, H., O'Donnell, P., Orshal, J., Fujii, H., Sun, B., Sonnenfeld, G. (2008) Active hexose correlated compound activates immune function to decrease bacterial load in a murine model of intramuscular infection. *Am. J. Surg.* **195,** 537–545.
155. Shearer, W. T., Ochs, H. D., Lee, B. N., Cohen, E. N., Reuben, J. M., Cheng, I., Thompson, B., Butel, J. S., Blancher, A., Abbal, M., Aviles, H., Sonnenfeld, G. (2009) Immune responses in adult female volunteers during the bed-rest model of spaceflight: antibodies and cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123,** 900–905.

KEY WORDS:
microgravity · deep-space mission · immune depression · stress

4. OBJECTIFS

Comme décrit dans la partie 3 de mon introduction, beaucoup d'études traitent de l'impact des vols spatiaux sur le système immunitaire à médiation cellulaire, mais peu d'études concernent l'immunité humorale, à savoir l'étude des LB et de la production des anticorps, alors que ceux-ci sont essentiels pour la défense de l'organisme lors d'une infection. C'est pourquoi il est important, à l'heure où les vols spatiaux envisagés sont de plus en plus longs (voyage vers Mars notamment), d'étudier l'impact de ces vols spatiaux sur ce pan de l'immunité. Ces recherches permettront de mieux connaître les mécanismes responsables de l'altération du système immunitaire et contribueront ainsi au développement de stratégies pour contrecarrer les effets délétères des vols spatiaux sur le système immunitaire. Le but étant de pouvoir garder l'équipage en bonne santé durant les missions spatiales de longues durées.

Durant ma thèse, j'ai pu travailler sur deux modèles animaux différents :

Le premier modèle animal utilisé a été l'amphibien urodèle de la famille des *salamandridae : Pleurodeles waltl*, appelé plus communément pleurodèle (**fig. 19**). Ce modèle a été utilisé avec succès lors de missions spatiales (1999, 2006) et il est particulièrement intéressant à étudier puisque le laboratoire a préalablement montré que cet animal utilise le même mécanisme génétique que l'humain pour effectuer la recombinaison V(D)J lors de la synthèse des anticorps (Frippiat *et al.*, 2001). De plus, cette espèce nécessite peu d'entretien, ce qui est un avantage considérable lors d'un vol spatial, les embryons se développent seuls dans l'eau des aquariums, prennent peu de place, les adultes peuvent jeûner sans problème durant plusieurs semaines. Ainsi, le pleurodèle est un bon modèle d'étude du système immunitaire humoral suite à un vol spatial.

Les travaux de la JE2537 ayant montré que l'utilisation des familles de gènes VHII et VHVI sont différentes lorsque des pleurodèles adultes sont immunisés à bord de la station spatiale Mir, j'ai participé à une étude qui avait pour but d'étudier l'expression de chaque gène VHII et VHVI chez ces animaux (publication 2) afin de mieux comprendre comment est modifiée la réponse immunitaire humorale. J'ai ensuite participé à un autre travail dont l'objectif était de déterminer si un vol spatial affecte les mutations somatiques responsables de l'augmentation de l'affinité des anticorps (publication 3 du manuscrit).



Figure 19. *Pleurodeles waltl,* amphibien urodèle de la famille des *salamandridae.*

Je me suis ensuite interessé aux stress subis lors d'un vol spatial et à leurs conséquences sur le développement de l'immunité humorale. Pour cela, l'expérience AMPHIBODY a été réalisée. Cette expérience, menée en Avril 2006, a consisté à envoyer des embryons de pleurodèle âgés de 3 jours et ne produisant pas encore d'anticorps, dans la Station Spatiale Internationale (ISS), de telle sorte que le processus de recombinaison V(D)J et donc la synthèse des premiers anticorps, débute à bord de l'ISS (**fig. 1 de la publication 4**).

Le second modèle animal sur lequel j'ai effectué mes travaux de thèse a été la souris. Sur ce modèle, j'ai étudié les effets d'un changement de la gravité durant une période longue sur le système immunitaire. Pour cela, nous avons placé des souris C57BL/6 mâles âgées de 8 semaines pendant 21 jours à différents niveaux d'hypergravité (2G ou 3G, publication 5).

RESULTATS

PARTIE 1

EFFETS D'UN VOL SPATIAL SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE D'UN AMPHIBIEN ADULTE

Changements de l'expression des gènes VH d'anticorps après un séjour de longue durée dans l'espace

1. Introduction

Lors de l'expérience Genesis, huit pleurodèles adultes (quatre mâles et quatre femelles) ont été envoyés dans la station spatiale Mir. Malheureusement, suite à un problème de ventilation, six de ces huit animaux sont morts au 17^{e} et 18^{e} jours après le décollage. Les deux femelles restantes, V3R etV4R, ont été gardées dans des containers différents durant 5 mois à bord de la station et ont été immunisées avec des protéines bovines. En parallèle, deux autres pleurodèles, S1R et S4R, ont été immunisés dans les mêmes conditions mais sur Terre. Ces animaux sont, à ce jour les seuls à avoir été immunisés durant un séjour de longue durée dans l'espace. Suite à cette expérience, les membres du laboratoire Développement et Immunogénétique ont montré que l'expression des familles VHII et VHVI, utilisées pour fabriquer les chaînes lourdes d'IgM spécifiques en réponse à cette stimulation antigénique, est modifiée par le séjour dans l'espace (**fig. 18**, Boxio *et al.*, 2005). Chaque famille VH comprenant un ou plusieurs segments, nous avons voulu connaître la contribution de chaque segment VHII et VHVI au répertoire de chaînes lourdes d'IgM chez les animaux immunisés dans la station Mir et ceux immunisés sur Terre. Ces nouvelles analyses avaient pour objectifs de mieux comprendre et d'approfondir les précédents résultats.

2. Nombre de segments VHII et VHVI présents dans le génome de *P. waltl*

Avant d'étudier la contribution des différents segments VHII et VHVI utilisés pour construire les chaînes lourdes d'IgM, nous devions avant tout connaître le nombre de ces segments existant dans le génome de *P. waltl*. Par la méthode de Southern blotting, nous avons pu montrer qu'il y a de 1 à 3 segments VH appartenant à la famille VHII et de 4 à 6 segments VH appartenant à la famille VHVI dans le génome de cet amphibien.

3. Segments VH utilisés lors de la réponse humorale des animaux immunisés

Nous avons ensuite déterminé comment les animaux immunisés en vol ou au sol utilisent chacun des gènes VHII et VHVI pour créer les sites de liaison de leurs IgM spécifiques. Pour cela, nous avons amplifié par RT-PCR 5'RACE puis cloné les réarrangements VH-D-JH de chaîne lourde d'IgM présents dans la rate des 4 animaux immunisés et de 2 animaux non-immunisés élevés dans les conditions standard du laboratoire.

Une banque d'ADNc partiels de chaînes lourdes d'IgM a ainsi été créée pour chaque animal, mis à part pour les animaux non-immunisés dont les rates avaient été mélangées, et donc pour lesquels une seule banque a été créée. Des 5 banques obtenues, nous avons isolé et séquencé 100 clones contenant un domaine VHII et 78 clones contenant un domaine VHVI. Afin de déterminer de combien de segments VHII et VHVI dérivent ces ADNc, nous avons aligné les séquences des peptides signaux, précédés d'au moins 40 pb de 5'UTR, de tous les ADNc contenant un domaine VHII (données non-présentées) ou VHVI (**fig. 1A de la publication 2**) comme ce qui avait précédemment été réalisé pour analyser la réponse humorale de *Xenopus laevis* (Wilson *et al.*, 1992). Pour les ADNc contenant un domaine VHVI, un alignement supplémentaire a été réalisé avec les domaines VHVI complets et les segments VHVI.C et VHVI.D non-réarrangés (**fig. 1B de la publication 2**).

Ces alignements de séquences ont permi de déterminer qu'un seul segment VHII est utilisé pour créer les 100 réarrangements VHII-D-JH isolés à partir des animaux immunisés au sol ou en vol. La famille VHII étant observée dans 28% des ARNm de chaînes lourdes d'IgM pour les animaux immunisés sur Terre et dans 61% des ARNm de chaînes lourdes d'IgM pour les animaux immunisés dans Mir (**fig. 18**), nous pouvons conclure que l'expression du segment VHII est deux fois plus élevée chez les animaux soumis aux conditions spatiales.

Concernant les ADNc contenant un domaine VHVI, les deux phylogrammes ont révélé 4 groupes majeurs (**fig. 1 de la publication 2**). Ceci signifie que majoritairement 4 segments VHVI sont utilisés par les animaux immunisés pour fabriquer leurs chaînes lourdes d'IgM. Ces 4 gènes ont été appelés : VHVI.A, VHVI.B, VHVI.C et VHVI.D. Chez les animaux non-immunisés, seuls 2 ADNc correspondent à un de ces 4 segments (**fig. 1 de la publication 2**). Notons que pour le segment VHVI.D, deux sous-groupes sont observés indiquant qu'il existe probablement deux allèles pour ce segment. De manière intéressante, les groupes d'ADNc dérivant des gènes VHVI.A et VHVI.B sont uniquement composés de séquences provenant des animaux immunisés sur Terre. A partir du nombre d'ADNc isolés pour chaque gène VHVI, nous avons calculé la contribution de chaque segment aux chaînes lourdes d'IgM chez les animaux immunisés sur Terre et dans Mir. **Les figures 1 et 2 de la publication 2** montrent clairement que l'expression des segments VHVI est différente dans l'espace.

4. Expression individuelle des segments VHVI

Nous avons ensuite vérifié cette variation de l'expression des segments VHVI par PCR semi quantitative. Tout d'abord, nous avons réalisé des PCR saturantes (35 cycles) sur de

l'ADNc de rate des 4 animaux immunisés (**fig. 3A de la publication 2**) avec des amorces spécifiques des segments VHVI.B et VHVI.C. Les segments VHVI.A et VHVI.D étaient trop homologues (95% d'identité entre leurs séquences nucléiques) pour qu'on puisse définir des amorces les amplifiant séparément. Ces premières PCR confirment que le segment VHVI.B est presque exclusivement exprimé chez les animaux immunisés sur Terre alors que le segment VHVI.C est exprimé chez les 4 animaux. La spécificité des amorces a été vérifiée par restriction enzymatique des produits de PCR (**fig. 3B et 3C de la publication 2**). Après ces vérifications, nous avons quantifié les transcrits d'IgM fabriqués à partir des segments VHVI.B et VHVI.C. Le segment VHVI.B n'étant présent qu'à l'état de trace chez les animaux immunisés dans Mir, il n'a pas été quantifié chez ces derniers. Chez les 2 animaux immunisés sur Terre (S1R et S4R), le segment VHVI.B représente 11% des transcrits de chaînes lourdes d'IgM (**fig. 4A de la publication 2**) ce qui est en accord avec le résultat décrit dans la figure 2 de cette publication. Le segment VHVI.C représente, quant à lui, 17% des transcrits de chaînes lourdes d'IgM chez les animaux immunisés sur Terre et 27% chez les animaux immunisés dans Mir (**fig. 4B de la publication 2**). Pour les animaux immunisés sur Terre, ce résultat correspond à ce qui est observé dans la figure 2 de la publication, mais pour les animaux immunisés dans Mir ce résultat est supérieur à ce qui est obtenu dans la figure 2. Cette différence est probablement due au nombre moins élevé de clones séquencés pour les animaux immunisés dans Mir (27 clones) par rapport au nombre de clones séquencés pour les animaux immunisés sur Terre (38 clones). Ces résultats de PCR semi-quantitative sont très stables entre les paires d'animaux d'une même condition ce qui est certainement dû au fait que les animaux sont consanguins.

Ces résultats démontrent clairement que le séjour dans l'espace a provoqué une augmentation de l'expression des segments VHVI.C et VHII, et une diminution de l'expression des segments VHVI.A et VHVI.B. Chaque lymphocyte B n'exprimant qu'un seul réarrangement de chaîne lourde d'anticorps, ces résultats suggèrent fortement que des populations différentes de lymphocytes B ont été sélectionnées dans l'espace. Ce changement d'expression des segments VH chez les animaux V3R et V4R ne peut pas être dû à une infection à bord de la station Mir car les 2 animaux étaient dans des containers séparés du 19^{e} jour de l'expérience jusqu'à la fin de la mission. Ces changements ne peuvent pas non-plus être attribués à une différence du répertoire de segments VH entre les animaux immunisés dans Mir et ceux immunisés sur Terre car nos pleurodèles sont consanguins et nous avons précédemment observé une expression similaire des familles de segments VH chez des pleurodèles adultes non-immunisés (Boxio *et al.*, non publié). Ces changements sont donc

certainement dûs à un effet du séjour dans l'espace sur le système immunitaire. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que la microgravité réelle et simulée modifient la composition lymphocytaire de la rate (Vernikos, 1996 ; Pecaut *et al.*, 2000 ; O'Donnell *et al.*, 2009). Ce changement de la composition cellulaire pourrait expliquer pourquoi des lymphocytes B différents ont été sélectionnés en microgravité. D'autres facteurs, comme les radiations, pourraient également induire un changement des populations lymphocytaires spléniques (Gridley *et al.*, 2002 ; 2008).

5. Variabilité des régions CDR3 des réarrangements VHII-D-JH

Comme les réarrangements VHII-D-JH sont observés chez les animaux immunisés et non-immunisés, nous avons étudié leur région CDR3 afin d'être sûr que ces réarrangements sont impliqués dans la réponse immunitaire. Comme chez l'humain, la région CDR3 d'une chaîne lourde d'anticorps de pleurodèle est hypervariable. Cette région contient la fin du segment VH, un ou deux éléments D et le début du segment JH. Entre ces éléments sont rajoutés des séquences palindromiques (P) et des nucléotides aléatoires (N) durant la recombinaison VDJ. Nous avons calculé la diversité jonctionnelle des 100 réarrangements VHII-D-JH séquencés. Nous avons mesuré la longueur en nucléotides des parties hypervariables (D+N+P) des CDR3 et la longueur de ces CDR3. Le ratio R entre la valeur de D+N+P et la longueur de CDR3 a ensuite été calculé pour chaque séquence. Ce ratio indique la variabilité de chaque CDR3. La moyenne de ces 3 valeurs a ensuite été calculée (D+N+P, CDR3, R) pour les 4 animaux immunisés et les 2 animaux non-immunisés. Ces 3 valeurs moyennes ne sont pas statistiquement différentes entre les 4 animaux immunisés mais diffèrent nettement de celles des animaux non-immunisés (**table 2 de la publication 2**). De plus, il faut noter que les anticorps reconnaissant des protéines possèdent un CDR3 de chaîne lourde d'environ 10.9 acides aminés (Collis *et al.*, 2003). Cette valeur est similaire à la valeur moyenne observée pour les 4 animaux immunisés (33 pb soit 11 acides aminés). Cette observation est logique car les animaux ont été immunisés avec des protéines bovines. Ces données confirment donc que les réarrangements VHII-D-JH chez les animaux immunisés ont bien été sélectionnés suite à la stimulation antigénique.

PUBLICATION 2

Faseb Journal, 2009

The FASEB Journal article fj.08-121327. Published online January 13, 2009.

Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*

Matthieu Bascove,* Cécile Huin-Schohn,*,† Nathan Guéguinou,* Eric Tschirhart,† and Jean-Pol Frippiat*,[1]

*EA 3442, Nancy-University, Laboratory of Experimental Biology and Immunology, Development and Immunogenetics Group, Vandœuvre-lès-Nancy, France; and †University of Luxembourg, Life Sciences Research Unit, Luxembourg

ABSTRACT **Understanding why the immune system is depressed during spaceflight is of obvious importance for future human deep-space missions, such as the foreseen missions to Mars. However, little is known about the effects of these flights on humoral immunity. We previously immunized adult *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) onboard the Mir space station and showed that heavy-chain variable (VH) domains of specific IgM antibodies are encoded by genes belonging to the VHII and VHVI families. We have now determined how these animals use their individual VHII and VHVI genes by screening IgM heavy-chain cDNA libraries and by quantifying IgM heavy-chain transcripts encoded by these genes. Results were compared with those obtained using control animals immunized on Earth under the same conditions as onboard Mir. Our experiments revealed an increase in the expression of IgM heavy-chain mRNAs encoded by the VHII and VHVI.C genes and a strong decrease in the expression of IgM heavy-chain mRNAs encoded by the VHVI.A and VHVI.B genes in spaceflight animals. Consequently, different heavy-chain mRNAs are expressed by spaceflight animals, demonstrating that this environment affects the humoral response. These observations may be due to a change in B-cell selection under spaceflight conditions. Bascove, M., Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Tschirhart, E., Frippiat, J.-P. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J.* 23, 000–000 (2009)**

Key Words: microgravity · B lymphocytes · selection · immune response · antibodies

Returning astronauts have experienced altered immune function and increased vulnerability to infection during spaceflights dating back to the Apollo and Skylab missions (1). During spaceflight, many factors, such as confinement, microgravity, biomechanical stresses, radiation, and disruption of the circadian rhythm combine to affect the immune system of humans and animals (2, 3). As plans for long-term missions continue to develop (*e.g.*, setting up a permanent inhabited base on the moon in the 2020s and human missions to Mars) (4), it is imperative that we understand the effects of spaceflight on the immune system because immunity alterations could seriously impair the ability of the host to deal with infection.

Until now, humoral immunity has only rarely been studied in astronauts. According to the few studies available, no significant changes in the plasma levels of immunoglobulin were observed after short-term spaceflights (5, 6), but increases were reported after long-term missions, particularly in total IgA and IgM (7).

In a first attempt to determine whether the humoral response is affected by spaceflight conditions, we performed the Genesis experiment during the Perseus mission. Adult *Pleurodeles waltl* (a urodele amphibian) remained in the Mir space station for 5 mo and were immunized. These are the only animals to have been immunized in space and are among the few vertebrates that have lived onboard a space station for an extended period of time. A previous study revealed that the heavy-chain variable (VH) domains of specific IgMs produced by immunized animals are encoded by genes belonging to the VHII and VHVI families (8). However, families II and VI were found in 28 and 58% of IgM heavy chains from animals immunized on Earth and in 61 and 24% of IgM heavy chains from animals immunized onboard Mir, respectively (8).

To delineate this modification of the immune response, we have now determined how individual VHII and VHVI genes have been used to construct specific IgM heavy chains in animals immunized either on Earth or in space. This study revealed quantitative and qualitative modifications in the expression of individual VH genes, thereby indicating that spaceflight affects the humoral immune response.

MATERIALS AND METHODS

Animals

We have reared *P. waltl* in our laboratory for 20 yr. Our animals are derived from those originally reared by Prof. Gallien in Paris in the 1960s and have never been bred with wild *P. waltl*. The initial breeding pool comprised 14 males and

[1] Correspondence: EA 3442, Nancy-University. Blvd. des Aiguillettes, BP 239. F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France. E-mail: jean-pol.frippiat@scbiol.uhp-nancy.fr

doi: 10.1096/fj.08-121327

10 females. Animals have consistently undergone brother–sister mating. As there are 2 breeding periods/yr (one from September to November and another one from February to April), 40 generations have been produced in our laboratory, and our animals are therefore considered inbred. In addition, they are reared under controlled conditions approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (agreement DDSV54/SPA/07/130). In these conditions, their life expectancy is ~8 yr.

We used *P. waltl* for our experiments because they are easy to rear. In addition, they are particularly convenient for space experiments (9) and our ground-based studies indicated that they use the same genetic V(D)J recombination machinery as humans to produce functional antibody genes (10). Furthermore, we demonstrated that *P. waltl* possesses three antibody isotypes, IgM, IgY, and IgP, which have human physiological counterparts (11). Indeed, IgM is a multimeric molecule, as in other vertebrates, and represents the most abundant isotype throughout the life of *P. waltl*. IgY is the physiological counterpart of mammalian IgA. IgP-expressing B cells are most probably the functional counterpart of mammalian B1 cells and participate in the protection of *P. waltl* larvae. IgP represents 30% of the antibodies in the spleen prior to metamorphosis (*i.e.*, during larval life) but <8% of the antibodies postmetamorphosis (metamorphosis is completed 5 to 7 mo after eggs are laid) (11). We also observed that IgP-producing B cells are replaced by IgY-producing B cells during the metamorphosis of *P. waltl* (11).

Finally, we demonstrated that *P. waltl* possesses at least 10 families of VH genes, 8 JH and 8 D segments in its genome, and that it uses these genes and segments in the same way as humans to create functional antibody heavy-chain genes (unpublished results).

The Genesis experiment

The Genesis experiment was performed from April 2, 1999 to August 28, 1999 onboard the Mir space station during the Perseus French-Russian mission. Three groups of 3-yr-old adult *P. waltl* were used in this experiment. The first group was composed of 2 unimmunized *P. waltl*, which were reared in classic conditions in our animal facilities. The second group was composed of 2 *P. waltl* that stayed onboard Mir for 5 mo. These animals, called V3R and V4R, were reared in classic conditions in our animal facilities before the flight, but the feeding and living conditions were modified in the space station. Animals were immunized, kept in the dark in boxes inserted in a temperature-controlled unit (18±2°C) on dampened towels and force-fed 3×/wk. The food was administrated using a syringe with a catheter, because *P. waltl* cannot take food themselves in microgravity. After the return to Earth, animals were reared in classic conditions until their sacrifice 10 days later. Originally, 4 males and 4 females were launched, but only 2 females survived. The other 6 animals died on d 17 or 18 after launch by anoxia due to a breakdown in the ventilation system. After this incident, it was decided to keep the 2 surviving females in separate boxes, which were ventilated twice a day until the end of the mission. The third group was composed of 2 *P. waltl*, S1R and S4R, which were immunized with the same antigen and reared in our laboratory in the same conditions as onboard Mir. Animals were treated in accordance with national legislation and the Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes 86/609/EEC. Additional experimental details about animals rearing conditions have been described previously (12).

Southern blot analysis

The genome of *P. waltl* has been estimated to be approximately 10 times larger than the human genome, but this size appears to be due to repetitive DNA and not polyploidy (13). *P. waltl* is diploid ($2n=24$) (14), and we previously have established that its IgM, IgP, and IgY heavy-chain cDNAs are derived from single-copy CH genes (11). Genomic Southern blot analysis was performed with 65 μg of *P. waltl* liver genomic DNA digested with *Bam*HI, *Kpn*I, or *Pst*I, fractionated on 0.8% agarose gels and transferred to Hybond N^+ nylon membranes (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Hybridization with [α-^{32}P]dCTP-labeled VHII family- or VHVI family-specific probes and high-stringency washes were performed as described (15). VHII and VHVI probes were obtained by polymerase chain reaction (PCR) using primers VHIIA + VHIIB and VHVIA + VHVIB, respectively (**Table 1**). Signals were detected using a Phosphorimager (Typhoon 9410; Amersham) after one night of exposure.

Construction and screening of the VH-Cμ cDNA libraries

The spleen was removed from the 2 animals reared in classic conditions on Earth (unimmunized controls), and total RNA

TABLE 1. *Primers used in this work*

Name	Sequence (5′ to 3′)	Location	Annealing temperature (°C)
CMGSP1	CCA GGT GAA GGT GGT TGA GTC GGG AGG	Cμ1	64
CU3	TGA CAA AGA AAC TGG AGA TGC GAG TTC AAA GAG	Cμ1–Cμ2	62
CU4	TGG GTT TCC ATT TTT CTT CTG GAG GTA GGC	Cμ3–Cμ4	62
VHIIA	CAG ATA ACT TTG ACC CAA TCG GGG TCA GAA ATC AG	VHII gene	60
VHIIB	CAG ATA GAG AGA GGA ACT GTC TGT GGA GGC GGT GAA TCT	VHII gene	60
VH2gen	GGA GGC GGA TTA TTC TTA C	VHII 5′ UTR	58
VHVIA	TGC AGG AGT CCG GCC CTG GGA CTG TGA AGC CT	VHVI gene	60
VHVIB	CCG AGC ACA GTA AAA CGT GGC CGT GTC CTC TG	VHVI gene	60
VH6LB	CAA AAG GAG CTG AGA TCA CTT AAG	VHVI.B 5′UTR	62
VH6B	ATG CTG CCA GAA GAG TCG ATT TG	VHVI.B exon	62
VH6LC	TAA CAC AAA GGA GCT GAG ATC GT	VHVI.C 5′UTR	62
VH6C	GTG CTG CCA GAA GCG CAG ATT CC	VHVI.C exon	62
VH6Cgen	TTG TGC CTG TGT GTT CTT CTT CTT GCA TC	VHVI.C leader	64
VH6Dgen	AAG CAA AAG GAG ACG AGA TAA TTC C	VHVI.D 5′ UTR	64

was extracted from pooled splenocytes using the acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform method (16). The same technique was used to isolate total RNA from the spleens of S1R, S4R, V3R, and V4R. Using the Smart Race cDNA kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA), the Advantage 2 Polymerase Mix that contains a proofreading polymerase (Clontech) and the CMGSP1 primer (Table 1), which anneals to the Cμ1 exon that encodes the first constant domain of the *P. waltl* IgM heavy chains, we amplified the VH-D-JH rearrangements contained in the IgM heavy-chain mRNAs from the spleens of S1R, S4R, V3R, V4R, and the mixture of the spleens of the 2 unimmunized *P. waltl* by 5′-RACE PCR. For each RNA sample, a PCR product of 0.6 kb containing the VH-D-JH rearrangements joined to Cμ was amplified, gel purified, and cloned in the pGEM-T Easy vector (Promega, Lyon, France) to produce 5 VH-Cμ cDNA libraries. There was 1 library/animal, except for the unimmunized animals, which were pooled. Probes specific for the VHII or VHVI families (those used for the Southern blot analyses) were labeled with [α-^{32}P]dCTP and used to screen the 5 VH-Cμ cDNA libraries by colony hybridization. Clones that hybridized to the VHII family-specific probe contained VHII-D-JH rearrangements joined to Cμ, while those that hybridized to the VHVI family-specific probe contained VHVI-D-JH rearrangements joined to Cμ. We randomly chose 100 clones that hybridized to the VHII family-specific probe (21 from the library made from unimmunized animals, 22 from the V3R library, 21 from the V4R library, 19 from the S1R library, and 17 from the S4R library) and 78 that hybridized to the VHVI family-specific probe (5 from the library made from unimmunized animals, 17 from the V3R library, 15 from the V4R library, 23 from the S1R library, and 18 from the S4R library). We sequenced the whole inserts of these 178 clones. We were only able to isolate 5 VHVI-positive clones from the library made from unimmunized animals because the VHVI family is rarely used when animals are not immunized (8). Sequence analyses were performed using free online software from the Pasteur Institute (http://bioweb.pasteur.fr). Sequence alignments were performed using ClustalW (17).

We estimated the error rate of the Advantage 2 Polymerase Mix using the sequence of Cμ1 (the exon encoding the first constant domain of the IgM heavy chains). Indeed, a part of this exon was amplified with the VHII-D-JH and the VHVI-D-JH rearrangements when we performed the 5′-RACE PCR, and it has been demonstrated (18) that the constant regions of Ig chains are not the target of somatic hypermutations. In a total of 12,087 bases sequenced, we identified 11 mutations, indicating an error rate of 0.09%. While this rate is slightly greater than the error rate calculated by the manufacturer (25/100,000 bp after 25 PCR cycles), it still remains low. The error rate that we have determined suggests that 0.291 mutations/VH sequence are produced by the Advantage 2 Polymerase Mix.

Cloning of the VHII, VHVI.C, and VHVI.D genes of *P. waltl*

We used the Universal GenomeWalker kit (Clontech), *P. waltl* genomic DNA, and the VH2gen, VH6Cgen, and VH6Dgen primers (Table 1) to isolate the VHII, VHVI.C, and VHVI.D genes in their germline configurations. Primer VH6Cgen was located at the beginning of the leader sequence of the cDNAs derived from VHVI.C (**Fig. 1*A***). Primers VH2gen and VH6Dgen were located in the 5′ UTR of the cDNAs derived from VHII and VHVI.D, respectively. The Universal GenomeWalker kit generated PCR products that began at the end of the VH2gen, VH6Cgen, and VH6Dgen primers and extended into the adjacent genomic DNA. PCR products were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) and sequenced on both strands to provide the genomic sequences of the VHII, VHVI.C, and VHVI.D genes starting from primers VH2gen, VH6Cgen, and VH6Dgen. Because the VH6Cgen primer was located in the leader sequence, the first 15 bp of the VHVI.C leader exon are missing. These genomic sequences have been submitted to the European Molecular Biology Laboratory (EMBL; Heidelberg, Germany) database and have been assigned the accession numbers FM877013, FM877014, and FM877015.

Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) on RNA extracted from the spleen

Specific reverse transcription was performed using 1 μg of spleen RNA from the various animals, primer CU4 (Table 1), and MMLV-reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a final volume of 20 μl. Primer CU4 was designed to anneal to the end of the third and the beginning of the fourth constant domains of the *P. waltl* IgM heavy chains to ensure that it could not hybridize to genomic DNA. Using VHVI.B-(VH6LB+VH6B), VHVI.C-(VH6LC+VH6C), or Cμ-specific (CU3+CU4) primers (Table 1) and Goldstar *Taq*DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium), we performed 35-cycle PCR reactions with 1 μl of the generated cDNA. Primers VH6LB and VH6LC were located in the 5′ UTR upstream of the VHVI.B and VHVI.C leader exons, while primers VH6B and VH6C were located in the VHVI.B and VHVI.C exons to ensure that genomic DNA could not be amplified. For the same reason, primer CU3 was located at the junction between the Cμ1 and Cμ2 exons. VHVI.B (260 bp) and VHVI.C (264 bp) PCR products were digested with *Bpi*I and *Sma*I to verify the specificity of the amplifications. As expected, the VHVI.B PCR products were completely digested by *Bpi*I but not by *Sma*I, and the VHVI.C PCR products were completely digested by *Sma*I but not by *Bpi*I. The expected lengths for the digestion products were observed in both cases. These data demonstrate the specificity of our VHVI.B and VHVI.C primers. Negative controls were performed with spleen RNA.

Semiquantitative RT-PCR

We first determined the exponential range of the PCR reactions with spleen cDNA prepared as indicated above; the VHVI.B-, VHVI.C-, and Cμ-specific primers; and Goldstar *Taq*DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). Experiments were performed at least 4 times with 23 cycles of amplification. Signals were quantified using Geldoc 2000 and Quantity One v.4.3.1 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Negative controls were performed without cDNA or with spleen RNA that was not reverse transcribed. VHVI.B and VHVI.C signals were expressed as a percentage of the total amount of IgM heavy-chain mRNAs. Statistical significance was assessed by ANOVA analyses followed by the *post hoc* test of Newman-Keuls with a threshold lower than 5%.

RESULTS

Number of VHII and VHVI genes in the genome of *P. waltl*

We previously demonstrated that immunization induced the synthesis of IgM, in which the heavy chains are produced using genes of the VHII and VHVI families (8). Because VH families may contain several members, we performed Southern blot analyses to

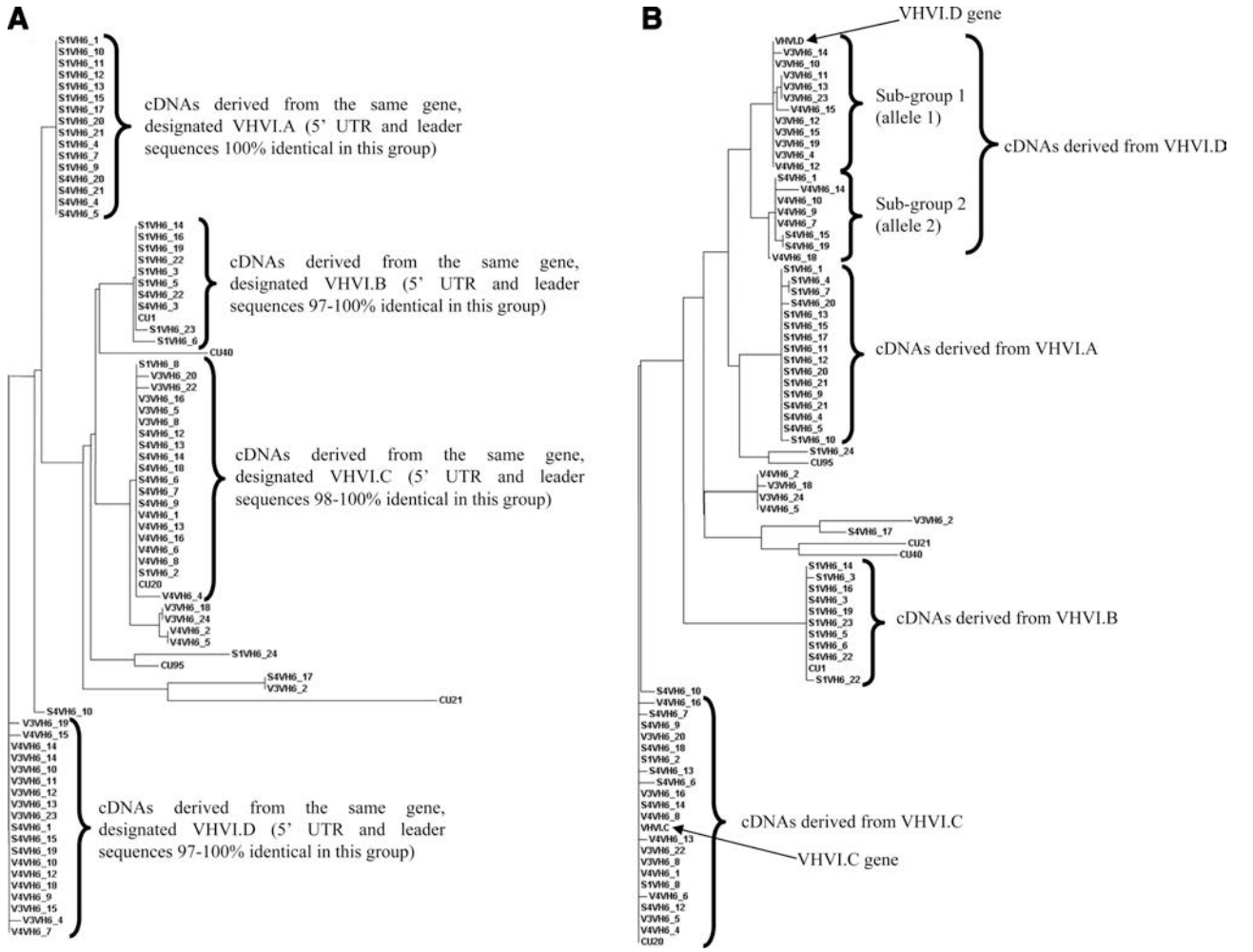


Figure 1. Phylograms constructed using ClustalW and the sequences of the leader exons preceded by 41 bp of 5′ UTR (*A*) or the sequences of the VH domains (*B*) of the 78 VHVI-D-JH rearrangements that were sequenced. VH domains of VHVI.C and VHVI.D genes were included in the second analysis. However, because we could not obtain sequences of the 41 bp of 5′ UTR preceding the VHVI.C and VHVI.D leader exons, these sequences were not included in the first analysis. Phylograms show four major groups, each derived from a different VHVI gene. Subgroups 1 and 2 correspond to potential alleles of the VHVI.D gene. Sequence names indicate from which animal the rearrangement was isolated (S1, S1R; S4, S4R; V3, V3R; V4, V4R; CU, control unimmunized animals), the VH family (VHVI), and the clone number. Note that the 5′ UTR and leader sequences are not always 100% identical because of few somatic hypermutations (unpublished results).

estimate the number of VH genes belonging to the VHII or VHVI families of *P. waltl*. The hybridization pattern obtained with the VHII family-specific probe revealed 1 to 3 bands, indicating that the *P. waltl* VHII family is composed of 1 to 3 VHII genes. Similarly, the VHVI family-specific probe revealed 4 to 6 bands, demonstrating that the VHVI family comprises 4 to 6 members (data not shown). These figures are estimates, because several VH genes of the same family could be on the same restriction fragment, or one gene could be cut into two fragments by a restriction enzyme.

Expression of individual VH genes

We next determined how many of these VHII and VHVI genes are used by our *P. waltl* to generate their IgM heavy chains. From our VH-Cμ libraries, we isolated 100 clones containing a VHII-D-JH rearrangement joined to Cμ and 78 clones containing a VHVI-D-JH rearrangement joined to Cμ. The inserts of these 178 clones were sequenced entirely, and 98% had an open reading frame. To determine how many VHII and VHVI genes these cDNAs were derived from, we compared the 5′ UTR and leader sequences (Fig. 1*A* for VHVI and data not shown for VHII) as done previously to analyze the humoral response of *Xenopus laevis* (19). To verify these results, we compared the sequences of the VHII domains from the 100 VHII-D-JH rearrangements with the one of the germline VHII gene (data not shown). In addition, a phylogram was constructed using the sequences of the VHVI domains from the 78 VHVI-D-JH rearrangements and the germline VHVI.C and VHVI.D genes (Fig. 1*B*).

These sequence alignments demonstrated that the 100 VHII-D-JH rearrangements joined to Cμ and the VHII gene have the same 5′ UTR and leader exons, as

well as very similar VH domains (data not shown). This indicates that these cDNAs are derived from the VHII gene that we have sequenced (accession number FM877013 in the EMBL database). Because we previously established that the VHII family is found in 28% of the IgM heavy-chain mRNAs from animals immunized on Earth and 61% of these mRNAs in animals immunized onboard Mir (8), we can conclude that the expression of this VHII gene is 2-fold greater in animals subjected to spaceflight conditions.

The results of the analyses of the VHVI-D-JH rearrangements are presented in Fig. 1. The phylograms reveal 4 major groups having identical or almost identical 5′ UTRs and leader sequences (Fig. 1*A*) and related VHVI domains (Fig. 1*B*). This indicates that 4 VHVI genes were used by the immunized animals to produce their IgM heavy-chain mRNAs. These 4 genes were arbitrarily named VHVI.A, VHVI.B, VHVI.C, and VHVI.D. Only 2 cDNAs from unimmunized animals, CU1 and CU20 (Fig. 1), corresponded to one of these 4 VHVI genes. Figure 1*B* also indicates that the cDNAs attributed to the VHVI.D gene form 2 subgroups, which suggests that there may be 2 alleles of this gene. The alignment of the complete cDNA sequences indicates that cDNAs from subgroups 1 and 2 have the same 5′UTR and leader sequences (see Fig. 1*A*) and that all VH sequences from subgroup 2 differ from those of subgroup 1 by 3 point mutations and 1 insertion of 3 bp (data not shown). This number of point mutations is not rare between alleles of V genes [see the tables of alleles presented in the ImMunoGeneTics (IMGT) database, http://imgt.cines.fr/] and polymorphisms by the insertion or deletion of few base pairs in V genes have already been described (20). Interestingly, Fig. 1 also shows that 2 groups of cDNAs, those derived from the VHVI.A and VHVI.B genes, are comprised only of sequences from animals immunized on Earth. **Figure 2** shows the contributions, calculated from the number of cDNAs attributed to each VHVI gene, of the VHVI genes to the IgM heavy-chain cDNAs of animals immunized on Earth or in the space station. Taken together, Figs. 1 and 2 indicate that the expression of individual VHVI genes is different under spaceflight conditions.

As a first step to verify this observation, we performed PCR reactions under saturating conditions (35 cycles of amplification) using cDNAs generated from the spleen of the 4 immunized animals (**Fig. 3*A***). Although primers specific for VHVI.B and VHVI.C could be designed, the VHVI.A and VHVI.D domains are too homologous (95% of identity between their nucleic sequences), and primers specifically amplifying these regions could not be defined. The PCR experiments confirmed that the expression of VHVI.B is almost exclusively restricted to animals immunized on Earth, while the expression of VHVI.C is observed in the 4 immunized animals. The specificity of our primers was demonstrated by both the complete digestion of the PCR products and the resulting expected lengths for the digestion products (Figs. 3*B, C*).

To verify the quantities of IgM heavy-chain transcripts encoded by the VHVI.B and VHVI.C genes (Fig. 2), we performed semiquantitative RT-PCR with our VHVI.B- and VHVI.C-specific primers, which generated amplicons of 260 and 264 bp, respectively. We could not produce smaller amplicons, as required for quantitative real-time PCR, because VHVI.B and VHVI.C belong to the same VH family and genes within a VH family share greater than 80% sequence homology (21). As seen in Fig. 3*A*, the expression of VHVI.B is very low in the spleens of V3R and V4R and was therefore not quantified. **Figure 4*A*** indicates that VHVI.B is found in 11% of the S1R and S4R IgM heavy-chain transcripts. This percentage is in agreement with the data presented in Fig. 2, which indicated that 15% of IgM heavy-chain mRNAs were derived from VHVI.B when animals are immunized on Earth. Figure 4*B* shows that VHVI.C is found in 17% of the IgM heavy-chain transcripts of animals immunized on Earth and in 27% of these mRNAs in animals immunized in space. Figure 2 shows a similar percentage (14%) of IgM cDNAs derived from VHVI.C for animals immunized on Earth but a lower value (10%) for animals immunized in space. This underestimation may be due to the fact that we did not sequence as many clones for flown animals (27 clones sequenced) as we did for animals immunized on Earth (38 clones sequenced). Figure 4*B* also shows that the expression of VHVI.C is 2 times greater when animals are immunized onboard Mir.

In conclusion, these studies demonstrate that 1 of the possible 1 to 3 VHII genes and 4 of the possible 4 to 6 VHVI genes existing in the genome of *P. waltl* are found in the VHII-D-JH and VHVI-D-JH rearrangements that were sequenced. Moreover, we clearly demonstrate that the expression of the VH genes is different when animals are immunized under spaceflight conditions.

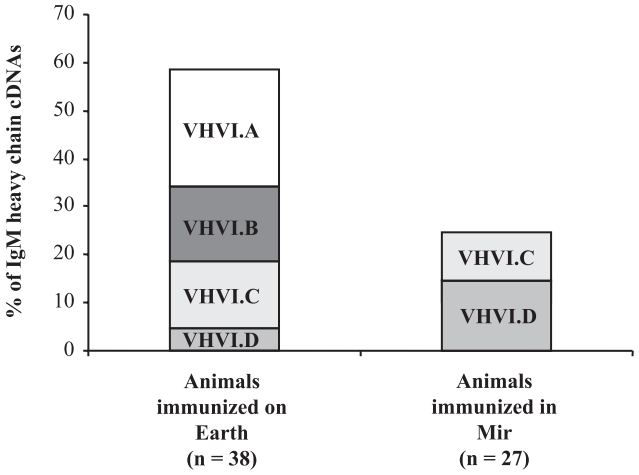


Figure 2. Contributions of the VHVI genes to the IgM heavy-chain cDNAs of animals immunized on Earth or in the Mir space station. Histograms were generated from the number of cDNAs attributed to each VHVI gene (see the four groups presented in Fig. 1), taking into account that the VHVI family is found in 58 and 24%, respectively, of the IgM heavy-chain cDNAs of animals immunized on Earth or in the space station (8). *n,* number of sequences analyzed.

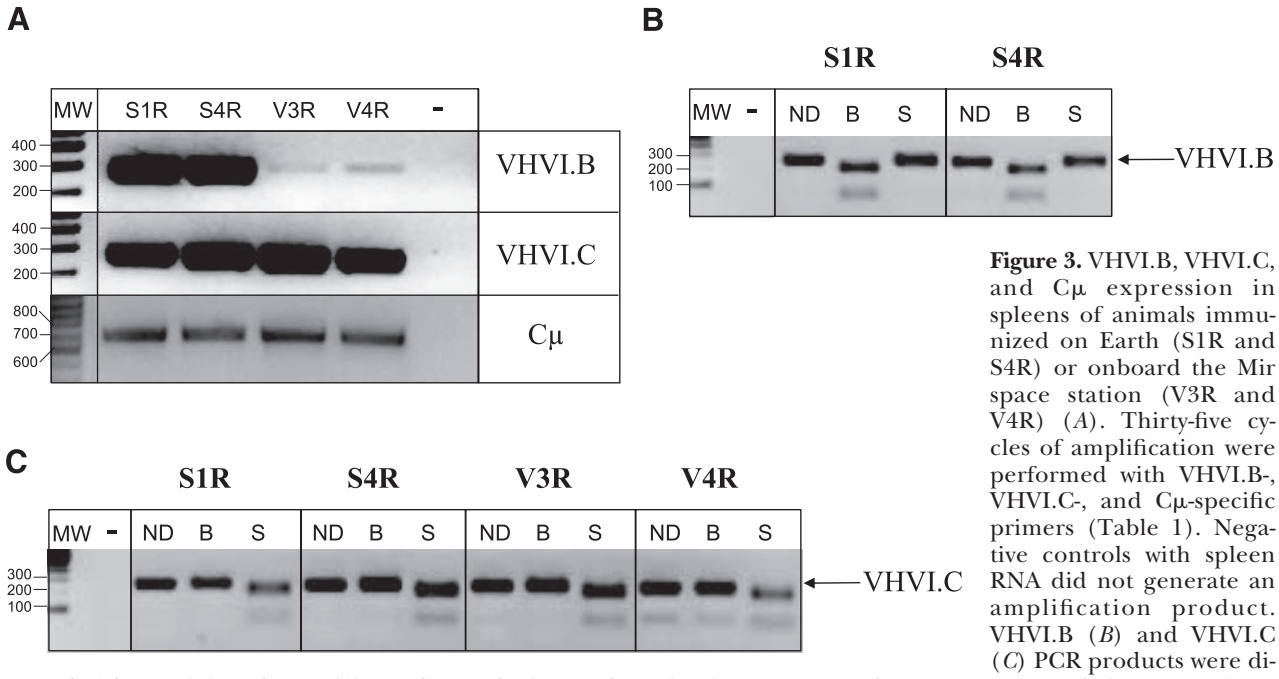


Figure 3. VHVI.B, VHVI.C, and Cμ expression in spleens of animals immunized on Earth (S1R and S4R) or onboard the Mir space station (V3R and V4R) (*A*). Thirty-five cycles of amplification were performed with VHVI.B-, VHVI.C-, and Cμ-specific primers (Table 1). Negative controls with spleen RNA did not generate an amplification product. VHVI.B (*B*) and VHVI.C (*C*) PCR products were digested with *Bpi*I (B) and *Sma*I (S). Undigested PCR products (ND) were run on the same agarose gels for comparison. VHVI.B PCR products were completely digested by *Bpi*I but not by *Sma*I, and VHVI.C PCR products were completely digested by *Sma*I but not by *Bpi*I, demonstrating the specificity of our VHVI.B and VHVI.C primers. Sizes (bp) of the 100-bp DNA ladder (MW) are indicated at left.

CDR3 regions of the VHII-D-JH rearrangements

Because VHII-D-JH rearrangements are found in the IgM heavy-chain cDNAs of immunized and unimmunized animals, we studied the CDR3 regions to ensure that the VHII-D-JH rearrangements of immunized animals were involved in the humoral response induced by the antigenic challenge. CDR3 is the third complementarity-determining region of Ig heavy chains. It confers the fine specificities of antibodies and is the most variable in both sequence and length of the 6 loops that compose the antigen binding site (22). CDR3 is composed of the end of a VH gene, a diversity (D) segment, and the beginning of a junction (JH) segment. Random nucleotides (N) and palindromes (P) are added at the boundaries between these genes and segments during the V(D)J recombination process (23, 24).

We calculated the junctional diversity (D+N+P) in CDR3s of the 100 VHII-D-JH rearrangements (**Table 2**). D + N + P is the sum of the length, in nucleotides, of the D segment, because it can be used in the 6 reading frames, and the non-germline-encoded N and P nucleotides. We also determined the length of the CDR3 and the ratio (R) between the junctional diversity and the CDR3 length (Table 2). R is a measure of the somatically generated diversity in CDR3s. As seen in Table 2, the D + N + P, CDR3, and R values of unimmunized animals are statistically different from the values observed in the 4 immunized animals. Moreover, Collis *et al.* (25) showed that the chief factor that influences the topography of the antigen binding site is the length of the CDRs, and Table 2 indicates that the mean length of IgM heavy-chain CDR3 is 8.8 residues in unimmunized animals and 11.1 residues in S1R, S4R, V3R, and V4R. Taken together, these data demonstrate that the VHII-D-JH rearrangements of IgM heavy-chain cDNAs from immunized animals are involved in the immune response induced by the antigenic stimulation.

DISCUSSION

Changes in VH gene expression under spaceflight conditions

Numerous logistical and technological hurdles exist when performing biological spaceflight experimentation (*e.g.*, we could not use rodents for the Genesis experiment), and a limited number of opportunities to conduct such research are available. Furthermore, these experiments are extremely expensive. Therefore, even when low numbers of samples are recovered from a space experiment, they deserve to be studied because they are rare and precious. Although small numbers of individuals were studied, our results show that a long-term spaceflight affects the expression of immunoglobulin VH genes in response to antigenic challenge. Indeed, our work indicates that animals immunized on Earth or in space used the same VHII gene to generate their IgM heavy chains, but the expression of this VHII gene is 2 times greater under spaceflight conditions. We also observed that animals immunized on Earth used four different VHVI genes to generate their IgM heavy chains, while animals immunized in space used only two VHVI genes (Fig. 2). Furthermore, the expres-

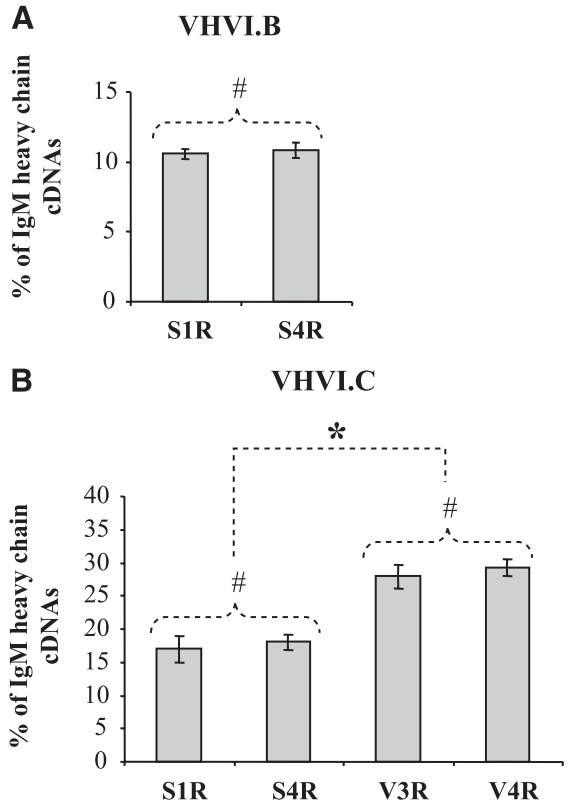


Figure 4. Contributions of VHVI.B (*A*) and VHVI.C (*B*) to the IgM heavy-chain mRNAs of animals immunized on Earth (S1R and S4R) or onboard the Mir space station (V3R and V4R), as determined by semiquantitative RT-PCR. mRNAs derived from VHVI.B were not detected at high enough levels to be quantified in the spleens of V3R and V4R (see Fig. 3*A*). Experiments were performed at least 4 times. Signals are expressed as percentage of total amount of IgM heavy-chain mRNAs. $^{*}P < 0.05$. $^{\#}P > 0.05$ (nonsignificant).

sion of the VHVI.C gene is increased in microgravity (Fig. 4*B*).

The use of the VHVI.B and VHVI.C genes was found to be similar in each pair of animals (Figs. 3 and 4). This stability has already been observed when we performed another immunological study on the same animals using a different technique (8) and is likely due to the fact that our *P. waltl* are inbred. To confirm this stability, and given the problem of sacrificing adults in a limited stock, we performed a complementary experiment on larvae. We randomly chose twelve 14-d-old *P. waltl* larvae derived from eggs produced by two different parental pairs. The quantification of IgM heavy-chain mRNAs in these larvae indicated that there is no difference between larvae derived from different parents (data not shown).

Several reports have indicated that short-term spaceflights affect the cellular immune system but have minimal effects on the humoral immune system (26). However, this work and the work of Konstantinova *et al.* (7) demonstrated that extended spaceflights (5 mo in this study and 8 mo in the study by Konstantinova *et al.*) affect the humoral immune system. This suggests that there is a differential sensitivity of the cellular and humoral immune systems to spaceflight conditions. A spaceflight-induced modification of the expression of some cytokines may contribute to this effect. Indeed, there is an inhibition of the production of IFN-γ in rats that have been exposed to a 1-wk spaceflight (27), and it has been demonstrated that if naive $CD4^{+}$ T cells react to type 1 signals, such as IFN-γ and IL-12, they differentiate into IFN-γ-secreting TH1 cells to fight intracellular pathogens; or, alternatively, in the presence of IL-4, they differentiate into TH2 cells whose main function is to promote humoral and antihelminth immunity (28). In addition, it has been demonstrated that T-lymphocyte responsiveness to mitogens is severely depressed by short spaceflights, because the expression of both IL-2 and IL-2Rα genes was significantly inhibited (29, 30).

Potential causes of the spaceflight-associated changes in VH gene expression

The changes in the expression of the VHII and VHVI genes are unlikely due to an infection by an unknown antigen in the space station, as V3R and V4R were kept in separate boxes from d 19 of the experiment until the end of the space mission 129 d later. It is also unlikely that these changes result from a difference in the germline repertoire between the spaceflight and the ground-based animals because *1*) our *P. waltl* are inbred, *2*) we previously observed a similar VH family use between unimmunized *P. waltl* (unpublished results) and *3*) a similar VH family use was observed between animals immunized with the same antigen (8). Consequently, these changes in the VH gene expres-

TABLE 2. *Diversity in CDR3 regions of VHII-D-JH rearrangements*

	Not immunized on Earth	Immunized on Earth		Immunized in space	
Value	Control (n=21)	S1R (n=19)	S4R (n=17)	V3R (n=22)	V4R (n=21)
D+N+P	15.05 ± 0.54*	9.89 ± 1.17#	8.94 ± 0.85#	9.77 ± 0.97#	10.19 ± 0.83#
CDR3	26.52 ± 1.13*	33.89 ± 1.16#	32.53 ± 1.12#	32.73 ± 0.99#	34.14 ± 1.20#
R	0.59 ± 0.03*	0.28 ± 0.02#	0.27 ± 0.02#	0.29 ± 0.02#	0.29 ± 0.02#

D + N + P and CDR3 lengths are expressed in nucleotides. *n,* number of sequences analyzed. $^{*}P < 0.05$ *vs.* S1R, S4R, V3R, and V4R. $^{\#}P > 0.05$ (nonsignificant).

sion most likely reflect the effect of the spaceflight on the immune response.

The antibody response derives from the naive antibody repertoire created by rearrangement of V, D (only for the heavy chains), and J genes and segments (23). This combinatorial process, known as V(D)J recombination, creates a naive antibody repertoire that has an enormous range of binding specificities, with each B lymphocyte expressing a different recombination product. Following antigenic stimulation, few preexisting B lymphocytes (*i.e.*, those that are able to bind the antigen) are selected, and this population expands. As we previously demonstrated that the expression of RAG1 (recombination-activating gene 1) is residual in 2-yr-old adult lymphoid tissues (10), the 3-yr-old adult *P. waltl* that we immunized in this study have completely undergone V(D)J rearrangements. Consequently, the naive antibody repertoires of these animals are fixed, and the immunization will induce the selection of preexisting B cells. As shown in Table 2, the antigen selected IgM heavy chains whose CDR3 regions have, on average, a junctional diversity of 9.7 bp, a length of 33 bp (11 aa) and an R value of 0.3. Interestingly, Collis *et al.* (25) demonstrated that there is a direct correlation between the lengths of CDRs and the nature of the antigen and showed that antibodies that recognize proteins have long heavy-chain CDR3s of 10.9 residues on average. This value is similar to the values determined for S1R, S4R, V3R, and V4R (Table 2) because these animals were immunized with proteins. The effects of selection were also seen when we determined how the families of VH genes were used in response to antigenic challenge (8). Indeed, families I and II were observed in the IgM heavy chains of unimmunized animals, while families II and VI composed the IgM heavy-chain mRNAs of immunized animals. We also observed differences in the expression of these two last families between animals immunized on Earth and those immunized in space (8). We have now established that these differences are due to an increase in the expression of IgM heavy-chain mRNAs derived from the VHII and VHVI.C genes and a strong decrease in the expression of IgM heavy-chain mRNAs derived from the VHVI.A and VHVI.B genes in spaceflight animals. Thus, different VH-D-JH rearrangements are expressed in spaceflight animals, suggesting that different IgM-producing B lymphocytes are selected in these environmental conditions.

During spaceflight, animals were subjected to microgravity, stress, and radiation. As such, spaceflight has been shown to modify the leukocyte distribution in organisms (31, 32). This could be mediated by changes in adhesion molecules (5, 33), and the redistribution of body fluids from the lower extremities to the head in the microgravity environment (34). Recent studies have indicated that mouse splenic lymphocyte percentages are changed after short-term spaceflight (31). Similar observations were made using hind-limb-unloaded mice, a rodent model currently used to simulate some aspects of spaceflight conditions (35). O'Donnell *et al.* (36) demonstrated a significant reduction in splenic B cells and NK cells in mice exposed to hind-limb unloading with a concomitant increase in T cells. These data indicate that real and simulated microgravity induce lymphocyte subpopulation changes in the spleen. These changes in splenic composition may explain why the selected IgM-producing B lymphocytes are different in space.

Stress can also affect the distribution of leukocytes. Bennett and Daigle (37) demonstrated that lymphopenia and neutrophilia occur in the red-spotted newt *Notophthalamus viridescens* (another urodele amphibian) when it is treated with hydrocortisone or ACTH (adrenocorticotropic hormone), two hormones associated with stress, or when this organism is subjected to environmental stress. Lymphopenia, neutrophilia, and leukocytosis were also observed in marathon runners (38). Finally, it has been demonstrated that chronic stress may alter both cellular and humoral immune responses to vaccines (39, 40).

Radiation may also change the splenic lymphocyte populations. Several studies have shown that the mass and leukocyte populations of the spleen are modified when mice are subjected to various types of radiation (41–44). Significant decreases in IgG1, IgG2b, and IgG2a in mice exposed to chronic low-dose gamma irradiation have also been reported (45).

In conclusion, this work suggests that different IgM-producing B lymphocytes are selected when *P. waltl* are immunized under spaceflight conditions, likely because the cellular composition of the spleen is modified by microgravity, stress, and/or radiation. Because modifications of leukocyte distributions have been observed in spaceflight rodents (mice and rats) (33, 46), modifications of B-cell selection following antigenic challenge could also be observed in astronauts. FJ

We thank the French cosmonaut J.-P. Haigneré for performing the Genesis experiment onboard the Mir space station, N. Touche for helpful discussions, the Centre National d'Etudes Spatiales, the European Space Agency, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Nancy-University, the Lorraine Region, and the University of Luxembourg for their financial support. M.B. is supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and C.H.-S. is supported by the Ministry of Culture, Higher Education, and Research of Luxembourg.

REFERENCES

1. Kimzey, S. L. (1977) Hematology and immunology studies. In *Biomedical Results from Skylab* (Johnson, R. S., and Dietlein, L. F., eds) pp. 248–282, National Aeronautics and Space Administration, Washington, DC, USA
2. Borchers, A. T., Keen, C. L., and Gershwin, M. E. (2002) Microgravity and immune responsiveness: implications for space travel. *Nutrition* **18,** 889–898
3. Sonnenfeld, G., and Shearer, W. T. (2002) Immune function during space flight. *Nutrition* **18,** 899–903
4. Heppener, M. (2008) The future of humans in space. *EMBO Rep.* **9**(Suppl. 1), S4–S12
5. Stowe, R. P., Sams, C. F., Mehta, S. K., Kaur, I., Jones, M. L., Feeback, D. L., and Pierson, D. L. (1999) Leukocytes subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* **65,** 179–186
6. Voss, E. W., Jr. (1984) Prolonged weightlessness and humoral immunity. *Science* **225,** 214–215

7. Konstantinova, I. V., Rykova, M. P., Lesnyak, A. T., and Antropova, E. A. (1993) Immune changes during long-duration missions. *J. Leukoc. Biol.* **54,** 189–201
8. Boxio, R., Dournon, C., and Frippiat, J.-P. (2005) Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl. J. Appl. Physiol.* **98,** 905–910
9. Dournon, C. (2003) Developmental biology of urodele amphibians in microgravity conditions. *Adv. Space Biol. Med.* **9,** 101–131
10. Frippiat, C., Kremarik, P., Ropars, A., Dournon, C., and Frippiat, J.-P. (2001) The recombination-activating gene 1 of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) is transcribed in lymphoid tissues and in the central nervous system. *Immunogenetics* **52,** 264–275
11. Schaerlinger, B., Bascove, M., and Frippiat, J.-P. (2008) A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. *Mol. Immunol.* **45,** 776–786
12. Veynachter, L., Tankosic, C., Viso, M., Chaput, D., Husson, D., Gualandris-Parisot, L., and Dournon, C. (2002) A new method to force-feed and rear adult newts on board a space station. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* **2,** 100–108
13. Birnstein, V. J. (1983) Structural characteristics of genome organization in Amphibia: Differential staining of chromosomes and DNA structure. *J. Mol. Evol.* **18,** 73–91
14. Bailly, S., Guillemin, C., and Labrousse, M. (1973) Comparaison du nombre et de la position des zones spécifiques révélées sur les chromosomes mitotiques de l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. par les techniques de coloration au colorant de Giemsa et à la moutarde de quinacrine. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D* **276,** 1867–1869
15. Schaerlinger, B., and Frippiat, J.-P. (2008) IgX antibodies in the urodele amphibian *Ambystoma mexicanum. Dev. Comp. Immunol.* **32,** 908–915
16. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162,** 156–159
17. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Res.* **22,** 4673–4680
18. Jacobs, H., and Bross, L. (2001) Towards an understanding of somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* **13,** 208–218
19. Wilson, M., Hsu, E., Marcuz, A., Courtet, M., Du Pasquier, L., and Steinberg, C. (1992) What limits affinity maturation of antibodies in *Xenopus* - the rate of somatic mutation or the ability to select mutants? *EMBO J.* **11,** 4337–4347
20. Lefranc, M.-P., Pallarès, N., and Frippiat, J.-P. (1999) Allelic polymorphisms and RFLP in the human immunoglobulin lambda light chain locus. *Hum. Genet.* **104,** 361–369
21. Brodeur, P. H., and Riblet, R. (1984) The immunoglobulin heavy-chain variable region (Igh-V) locus in the mouse. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. *Eur. J. Immunol.* **14,** 922–930
22. Wu, T. T., Johnson, G., and Kabat, E. A. (1993) Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* **16,** 1–7
23. Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302,** 575–581
24. Komori, T., Okada, A., Stewart, V., and Alt, F. W. (1993) Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* **261,** 1171–1175
25. Collis, A. V., Brouwer, A. P., and Martin, A. C. (2003) Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J. Mol. Biol.* **325,** 337–354
26. Sonnenfeld, G., Butel, J. S., and Shearer, W. T. (2003) Effects of the space flight environment on the immune system. *Rev. Environ. Health* **18,** 1–17
27. Gould, C. L., Lyte, M., Williams, J. A., Mandel, A. D., and Sonnenfeld, G. (1987) Inhibition of interferon-gamma but normal interleukine-3 production from rats flown on the space shuttle. *Aviat. Space Environ. Med.* **58,** 983–986
28. Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383,** 787–793
29. Cogoli, A., Tschopp, A., and Fuchs-Bislin, P. (1984) Cell sensitivity to gravity. *Science* **225,** 228–230
30. Cogoli-Greuter, M. (2004) Effect of gravity changes on the cytoskeleton in human lymphocytes. *Gravit. Space Biol. Bull.* **17,** 27–37
31. Pecaut, M. J., Nelson, G. A., Peters, L. L., Kostenuik, P. J., Bateman, T. A., Morony, S., Stodieck, L. S., Lacey, D. L., Simske, S. J., and Gridley, D. S. (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. I. Immune population distributions. *J. Appl. Physiol.* **94,** 2085–2094
32. Sonnenfeld, G., Mandel, A. D., Konstantinova, I. V., Berry, W. D., Taylor, G. R., Lesnyak, A. T., Fuchs, B. B., and Rakhmilevich, A. L. (1992) Spaceflight alters immune cell function and distribution. *J. Appl. Physiol.* **73,** 191S–195S
33. Grove, D. S., Pishak, S. A., and Mastro, A. M. (1995) The effect of a 10-day space flight on the function, phenotype, and adhesion molecule expression of splenocytes and lymph node lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* **219,** 102–109
34. Vernikos, J. (1996) Human physiology in space. *BioEssays* **18,** 1029–1037
35. Morey-Holton, E. R., and Globus, R. K. (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.* **92,** 1367–1377
36. O'Donnell, P. M., Orshal, J. M., Sen, D., Sonnenfeld, G., and Aviles, H. O. (2009) Effects of exposure of mice to hindlimb unloading on leukocyte subsets and sympathetic nervous system activity. *Stress.* **12,** 82–88
37. Bennett, M. F., and Daigle, K. R. (1983) Temperature, stress and the distribution of leukocytes in red-spotted newts, *Notophthalamus viridescens. J. Comp. Physiol.* **153,** 81–83
38. Bouic, P. J., Clark, A., Lamprecht, J., Freestone, M., Pool, E. J., Liebenberg, R. W., Kotze, D., and van Jaarsveld, P. P. (1999) The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *Int. J. Sports Med.* **20,** 258–262
39. Glaser, R., Sheridan, J., Malarkey, W. B., MacCallum, R. C., and Kiecolt-Glaser, J. K. (2000) Chronic stress modulates the immune response to a pneumococcal pneumonia vaccine. *Psychosom. Med.* **62,** 804–807
40. Glaser, R., and Kiecolt-Glaser, J. K. (2005) Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat. Rev. Immunol.* **5,** 243–251
41. Pecaut, M. J., Nelson, G. A., and Gridley, D. S. (2001) Dose and dose rate effects of whole-body gamma-irradiation: I. Lymphocytes and lymphoid organs. *In Vivo* **15,** 195–208
42. Gridley, D. S., Pecaut, M. J., Dutta-Roy, R., and Nelson, G. A. (2002) Dose and dose rate effects of whole-body proton irradiation on leukocyte populations and lymphoid organs: part I. *Immunol. Lett.* **80,** 55–66
43. Pecaut, M. J., Dutta-Roy, R., Smith, A. L., Jones, T. A., Nelson, G. A., and Gridley, D. S. (2006) Acute effects of iron-particle radiation on immunity. Part I: Population distributions. *Radiat. Res.* **165,** 68–77
44. Gridley, D. S., Rizvi, A., Luo-Owen, X., Makinde, A. Y., Coutrakon, G. B., Koss, P., Slater, J. M., and Pecaut, M. J. (2008) Variable hematopoietic responses to acute photons, protons and simulated solar particle event protons. *In Vivo* **22,** 159–169
45. Courtade, M., Caratero, A., Jozan, S., Pipy, B., and Caratero, C. (2001) Influence of continuous, very low-dose gamma-irradiation on the mouse immune system. *Int. J. Radiat. Biol.* **77,** 587–592
46. Allebban, Z., Ichiki, A. T., Gibson, L. A., Jones, J. B., Congdon, C. C., and Lange, R. D. (1994) Effects of spaceflight on the number of rat peripheral blood leukocytes and lymphocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.* **55,** 209–213

Received for publication September 17, 2008.
Accepted for publication December 18, 2008.

Baisse de la fréquence des mutations somatiques lors d'un séjour spatial de longue durée

1. Introduction

Nous avons pu montrer (Boxio *et al.*, 2005 et publication 2 de ce manuscrit) une modification de l'utilisation des gènes VH lors de la synthèse des IgM suite à une immunisation par voie orale chez le pleurodèle ayant résidé 5 mois à bord de la station Mir, par comparaison aux animaux restés sur Terre. Afin de déterminer si les mutations somatiques, essentielles pour augmenter l'affinité de l'anticorps envers un antigène, sont modifiées lors d'un vol spatial, nous avons étudié la fréquence de ces mutations chez les animaux de l'expérience Genesis.

2. Nombre de mutations dans le gène VHII de *P. waltl*

Etant donné que le gène VHII est celui préférentiellement utilisé par *P. waltl* pour fabriquer ses IgM lors d'un vol spatial (Boxio *et al.*, 2005) et qu'un seul gène VHII est exprimé par cette espèce (Bascove *et al.*, 2009), nous avons décidé d'étudier les mutations somatiques de ce gène. Pour cela, nous avons aligné les séquences des ADNc contenant un réarrangement [VHII-D-JH-Cμ] avec la séquence VHII génomique de chaque animal. Nous avons ainsi pu dénombrer les mutations du gène VHII. Une vingtaine de séquences d'ADNc ont été alignées par animal (**fig. 1 de la publication 3**). Il a ainsi pu être dénombré 40 mutations chez les animaux immunisés en vol ou sur Terre et seulement 6 mutations chez les animaux non immunisés (**fig. 1 et 2 de la publication 3**). Parmi ces mutations, 75% d'entre elles provoquent un changement d'acide aminé. Aucune mutation par insertion ou délétion n'a été constatée. Ces mutations sont majoritairement des transitions (**fig. 2 de la publication 3**). Ces mutations ne sont pas concentrées dans les régions CDR, comme cela a déjà pu être observé chez le xénope (Wilson *et al.*, 1992 ; 1995). Ceci est très probablement dû au fait que chez ces espèces, il n'y a pas de centre germinatif et donc que la sélection des mutants ne peut s'opérer.

3. Fréquence des mutations somatiques

Afin de s'assurer que les mutations observées sur les séquences des gènes VHII des pleurodèles ne sont pas dues à des erreurs de la *Taq* polymérase ayant amplifié le segment VHII séquencé, un clone VHII a été amplifié par une PCR de 50 cycles. Le produit obtenu a été cloné et plusieurs clones ont été choisis aléatoirement et ont été séquencés pour

déterminer la fréquence des erreurs induites par la *Taq* polymérase. **La table 2 de la publication 3** montre que la fréquence des mutations A:T induite par la *Taq* polymérase est identique à celle observée chez les animaux de cette expérience, tandis que la fréquence des mutations G:C induite par l'enzyme est largement inférieure à celle observée chez les animaux de l'expérience Genesis. Ceci montre que les mutations A:T détectées chez les animaux immunisés à bord de Mir ou sur Terre sont dues à des erreurs de la *Taq* polymérase, alors que les mutations G:C sont des mutations somatiques. Ceci est en accord avec les résultats acquis chez le Xénope (Wilson *et al.*, 1992) et est étayé par le fait que la majorité de ces mutations G:C sont situées au sein de motifs cibles d'AID.

On note une baisse significative (d'un facteur 2) de ces mutations somatiques chez les animaux immunisés à bord de la station Mir par rapport aux animaux immunisés sur Terre (**table 2 de la publication 3**). Contrairement aux organismes endothermes (mammifères par exemple) chez lesquels les mutations somatiques peuvent affecter les 4 bases (A, G, T ou C), les organismes ectothermes (dont le pleurodèle fait partie) ont des mutations somatiques uniquement sur les bases G:C (**fig. 4 de la publication 3**).

4. Causes de cette baisse de fréquence des mutations somatiques

Afin de trouver l'origine de cette diminution de fréquence des mutations somatiques lors d'un vol spatial, nous avons quantifié par PCR en temps réel les transcrits d'AID (effecteur majeur des mutations somatiques) ainsi que de 4 membres de la famille NFkB (RelA, RelB, p100 et p105) afin de savoir si la baisse de fréquence de ces mutations est le fruit d'une altération de l'activation des cellules B dans l'environnement spatial, puisque cette famille joue un rôle clé dans la transduction du signal provenant du BCR (Vallabhapurapu & Karin, 2009). Etant donné le faible nombre d'individu par groupe (n=2), nous n'avons pas pu observer de différence statistique entre les 2 groupes de pleurodèles (**fig. 3 de la publication 3**). Nous ne pouvons donc pas savoir si ces facteurs sont responsables de la baisse de la fréquence de mutations somatiques observée sur les bases G:C. Cette baisse n'est en tout cas pas due à la quantité de nourriture ingérée, souvent diminuée pendant un vol spatial, puisque les animaux ont été gavés 3 fois par semaine par une même quantité de nourriture. De plus, il a été montré dans des études antérieures à celle-ci que la liaison de l'antigène au BCR ou au TCR n'est pas affectée par la microgravité (Maule *et al.*, 2003 ; Cogoli-Greuter *et al.*, 2004), écartant de ce fait la possibilité que les mutations somatiques soient diminuées par des perturbations de ces interactions. Les hypermutations sont diminuées de moitié chez des souris KO pour la protéine GANP (Germinal center-Associated

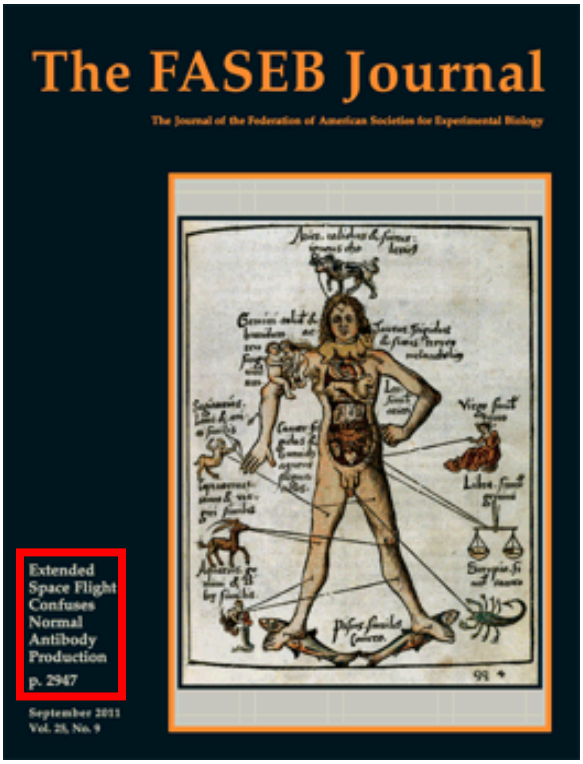
Nuclear Protein, un des facteurs intervenant dans le processus d'hypermutations dans le centre germinatif). La quantification des transcrits codant cette protéine chez les pleurodèles de notre expérience n'a pas révélé de différences entre les individus, écartant ainsi la responsabilité de GANP dans la différence observée. Nous pensons plutôt que cette diminution des mutations somatiques résulte de la combinaison de plusieurs modifications observées en vol telles que la très importante réduction de l'activation des LT (Cogoli *et al.*, 1984 ; Pippia *et al.*, 1996), les importantes perturbations du cytosquelette et les changements dans la distribution des lymphocytes (Sonnenfeld *et al.*, 1992 ; Ichiki *et al.*, 1996 ; Pecaut *et al.*, 2003 ; Gridley *et al.*, 2009) et l'expression des molécules d'adhésion (Grove *et al.*, 1995 ; Tian *et al.*, 2010).

5. Origine du biais G:C chez les ectothermes

Il a été constaté l'absence de biais dans les mutations somatiques lors de la maturation des anticorps chez le requin (Diaz *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2002), suggérant que deux mécanismes distincts existent chez les poissons cartilagineux : le premier ciblant les bases G:C, utilisé par tous les organismes ectothermes, et le second ciblant les 4 bases, utilisé par les organismes endothermes (**fig. 4 de la publication 3**). Le biais des mutations sur les bases G:C ne peut pas être attribué à l'absence de centre germinatif chez les animaux à sang froid puisque par exemple, des souris déficientes pour la lymphotoxine-α n'ont pas de centres germinatifs et ne présentent pas d'augmentation de la fréquence d'hypermutations sur les bases G:C (Matsumoto *et al.*, 1996). Ce biais ne s'explique pas non plus par l'absence d'un ou de plusieurs facteurs impliqués dans le processus des mutations somatiques car l'ensemble des facteurs impliqués dans ce processus ont été identifiés chez les poissons osseux. Cependant, nous pouvons supposer que des modifications dans l'activité des facteurs impliqués dans ce processus aient lieu chez les ectothermes, changeant leur interaction avec l'ADN cible, ce qui expliquerait de ce fait le biais observé. Par exemple, bien qu'observé chez la souris, il a pu être mis en évidence qu'une substitution d'un acide aminé d'une protéine intervenant dans le processus (PCNA, proliferating cell nuclear antigen) induit un biais dans les mutations puisqu'une réduction de plus de 90% des mutations sur les bases A:T a été observée suite a ce changement d'acide aminé (Langerak *et al.*, 2007).

PUBLICATION 3

Faseb Journal, 2011



The FASEB Journal article fj.11-185215. Published online May 18, 2011.

Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions

Matthieu Bascove,*,[1] Nathan Guéguinou,*,[1] Bérénice Schaerlinger,*,[2] Guillemette Gauquelin-Koch,† and Jean-Pol Frippiat*,[3]

*Faculty of Medicine, Development and Immunogenetics, Nancy-University, Vandœuvre-lès-Nancy, France; and †French National Space Agency, Paris, France

ABSTRACT **Somatic hypermutation diversifies antibody binding sites by introducing point mutations in the variable domains of rearranged immunoglobulin genes. In this study, we analyzed somatic hypermutation in variable heavy-chain (VH) domains of specific IgM antibodies of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*, immunized either on Earth or onboard the Mir space station. To detect somatic hypermutation, we aligned the variable domains of IgM heavy-chain transcripts with the corresponding VH gene. We also quantified NF-κB and activation-induced cytidine deaminase transcripts. Results were compared with those obtained using control animals immunized on Earth. Our data show that, as in most species of ectotherms, somatic hypermutation in *P. waltl* exhibits a mutational bias toward G and C bases. Furthermore, we show for the first time that somatic hypermutation occurs in space following immunization but at a lower frequency. This decrease is not due to a decrease in food intake or of the B-cell receptor/antigen interaction or to the absence of the germinal center-associated nuclear protein. It likely results from the combination of several spaceflight-associated changes, such as the severe reduction in T-cell activation, important perturbations of the cytoskeleton, and changes in the distribution of lymphocyte subpopulations and adhesion molecule expression.—Bascove, M., Guéguinou, N., Schaerlinger, B., Gauquelin-Koch, G., Frippiat, J. -P. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J.* 25, 000–000 (2011). www.fasebj.org**

Key Words: microgravity · immune response · immunoglobulin · affinity maturation · B lymphocytes

In jawed vertebrates, the adaptive immune system is composed of B and T lymphocytes and employs antigen receptors, immunoglobulins, and T-cell receptors, which are not encoded in the germline but are generated *de novo* in each organism through the RAG1- and RAG2-mediated assembly of functional genes from individual variable (V), diversity (D), and joining (J) gene segments. This process occurs exclusively in B- and T-cell progenitors and is supported by DNA repair factors (1). Immunoglobulin functions first as a membrane-bound receptor that allows for selection, diversification, and affinity maturation. In secondary lymphoid organs, B cells encounter antigens and undergo class switch recombination and somatic hypermutation (SHM). SHM is initiated by the activation-induced cytidine deaminase (AID), which deaminates cytidines into uracils within the V(D)J exon of the immunoglobulin gene, leading to U:G mismatches (2). DNA synthesis over the U:G lesion or the abasic site that is formed by excision of the uracil, through the action of a uracil-DNA glycosylase (UNG), is seen as leading to mutations at C:G pairs. Recognition of the U:G lesion by the mismatch repair heterodimer MSH2/MSH6 induces mutations at A:T pairs (3). These mutations may alter the affinity or specificity of the receptor for the antigen. B cells that encode higher-affinity antibodies specific for the antigen are positively selected.

Antibodies, VDJ rearrangement, and SHM are conserved in jawed vertebrates. Indeed, all jawed vertebrates have multiple isotypes that provide distinct effector functions, IgM being the most ancient antibody class (4). Furthermore, the two light-chain isotypes, κ and λ, emerged in a common ancestor of all living vertebrates (5). Although remarkable variation is seen in the organization of immunoglobulin genes, the mechanism of VDJ rearrangement is conserved across the diverse groups of jawed vertebrates (4, 6). Somatic hypermutation is also a feature of all living jawed vertebrates and can be traced to cartilaginous fishes (7).

We previously showed that the expression of IgY heavy chains (the counterpart of mammalian IgA molecules) is increased in flown *Pleurodeles waltl*, as previously reported in cosmonauts (8), and that the use of the different V gene subgroups (9) and the expression of individual V gene (10) are altered when *P. waltl* are immunized under spaceflight conditions. Consequently, we wondered whether their SHM response is also affected

[1] These authors contributed equally to this work.

[2] Current address: Nancy-University, URAFPA, Boulevard des Aiguillettes, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

[3] Correspondence: Nancy-University, Faculty of Medicine, Development and Immunogenetics, JE 2537, 9 Ave. de la forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. E-mail: jean-pol.frippiat@scbiol.uhp-nancy.fr

doi: 10.1096/fj.11-185215

due to changes in the expression of AID and/or NF-κB molecules that are involved in SHM and B-cell activation, respectively. This question is important because SHM is the first step in antibody affinity maturation, several studies have suggested that microbial virulence is enhanced under real and simulated microgravity, and up to 234 species of bacteria and microscopic fungi were identified in the Mir environment (reviewed in ref. 11). The space experiment was performed using adult *P. waltl* as an animal model because we could not use rodents for technical reasons, *P. waltl* can be maintained on dampened towels for prolonged periods (unlike *Xenopus laevis*), and it is impossible to do this kind of analysis on astronauts. Animals were hyperimmunized during a 5-mo stay in the Mir space station (9, 10). These are the only animals to have been immunized in space and are among the few vertebrates that have lived onboard a space station for an extended period of time. In this study, we took advantage of the fact that a single VHII gene is expressed by *P. waltl* in response to the antigenic challenge (10) to study somatic hypermutation in that species and determine the effect of spaceflight on this process. This is the first report about the effects of extreme conditions on SHM.

MATERIALS AND METHODS

Animals

We have raised *P. waltl* in our laboratory for 20 yr. Our animals are derived from those originally raised by Prof. Louis Gallien in Paris in the 1960s and have never been bred with wild *P. waltl*. The initial breeding pool comprised 14 males and 10 females. These animals have consistently undergone brother-sister mating and are therefore inbred. Animals were treated in accordance with national legislation and European Community Directive 86/609/EEC. Animal husbandry conditions were approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (agreement DDSV54/SPA/07/130). In these conditions, *P. waltl* life expectancy is ~8 yr.

Genesis experiment

This experiment was performed from April 2 to August 28, 1999, in the Mir space station. Three groups of 3-yr-old adult *P. waltl* were used in this experiment. The first group that was launched was composed of 4 males and 4 females, but only 2 females survived. Due to a breakdown in the ventilation system, the other 6 animals died by anoxia on d 17 or 18 after launch. After this incident, it was decided to keep the 2 surviving females in separate boxes, which were ventilated 2×/d until the end of the mission. These animals, called V3R and V4R, were raised in classic conditions in our animal facilities before the flight, but their feeding and living conditions were modified in the space station. Animals were kept in the dark in boxes inserted in a temperature-controlled unit (18±2°C) on dampened towels and force-fed 3×/wk with a diet that varied from their usual diet. This unusual food induced an immune response, as demonstrated by changes in VH gene subgroup expression, complementarity-determining region 3 (CDR3) length, and CDR3 diversity (9, 10). CDRs constitute the parts of the antibody V region that are implicated in antigen contact. V3R and V4R, therefore, comprised the group of in-flight hyperimmunized animals. The second group (Earth-immunized animals) was composed of 2 *P. waltl*, S1R and S4R, which were fed with the same diet and raised in our laboratory in the same conditions as those found onboard Mir. The third group (unimmunized controls) comprised 2 *P. waltl* reared in classic conditions in our animal facilities and fed with the normal diet. Animals from the 3 experimental groups were not killed until 10 d after landing because they had to first lay eggs for an investigation led by other scientists. Spleen and liver were collected, homogenized in guanidine thiocyanate lysis buffer, and frozen at −80°C.

Construction and screening of the VH-Cμ cDNA libraries

Total RNA was isolated from the spleen of S1R, S4R, V3R, and V4R and from pooled splenocytes of the 2 unimmunized animals, as described before (10). Using the Smart Race cDNA kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) and the CMGSP1 primer (**Table 1**), which anneals to the Cμ1 exon of *P. waltl*, we amplified the VH-D-JH rearrangements contained in IgM heavy-chain mRNAs by 5′-RACE. For each RNA sample, a PCR product of 0.6 kb was amplified, gel purified, and cloned in the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) to produce 5 VH-Cμ cDNA libraries. There was 1 library/animal, except for the unimmunized animals, whose splenocytes were pooled. A probe specific to the VHII gene subgroup of *P. waltl* was labeled with [α^{32}P]dCTP to screen the 5 VH-Cμ cDNA libraries by colony hybridization. Clones that hybridized to the VHII subgroup-specific probe contained VHII-D-JH rearrangements joined to Cμ. We randomly chose and sequenced 100 of these clones (21 from the library made from unimmunized animals, 22 from the V3R library, 21 from the V4R library, 20 from the S1R library, and 17 from the S4R library). Sequences were analyzed using free online software from the Pasteur Institute (http://bioweb.pasteur.fr).

Germline sequence of the VHII gene expressed in the VHII-D-JH rearrangements

The VHII gene that was used to produce specific IgM heavy chains in response to the antigenic challenge was isolated in its germline configuration for each animal by PCR using Goldstar *Taq* polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium), 50 ng of liver

TABLE 1. *Primers used in this study*

Name	Sequence, 5′ to 3′	Annealing temperature
CMGSP1	CCAGGTGAAGGTGGTTGAGTCGGGAGG	64°C
2B1	GGAGGCGGATTATTCTTAC	56°C
2B2	CTGGCCGTCAGTAGTTGACGCTGCACT	56°C
GANPs	CGACTTTGTGTGGAACCGTA	61°C
GANPas	GAGAAACAGTCGCTTGGTCA	61°C
AIDs	AGATTACTTTTACTGCTGGAATAC	57°C
AIDas	TAGAGCGGCTGAAGGATC	57°C
GAPDHs	GAAGGTAGTAAGCAACGCCTCCT	65°C
GAPDHas	CACAGCATGTACAGTGGTCATCA	65°C
RelAs	CATTCCAGGCGAAAGGAGTA	62°C
RelAas	GTCCTTGCCAACAAGCTCAT	62°C
RelBs	AGACTGCCACGACGGAATC	59°C
RelBas	AACATTCATATCCACCTCCTCTTG	59°C
p100s	TCCTGGATCCTGAACTGAAA	59°C
p100as	GTCTGGGAGATAGGCGGTAA	59°C
p105s	CGGAAGCGGAAGTAGAAGTG	63°C
P105as	TGAACGGCAAGCAGCATC	63°C

genomic DNA, and specific primers (2B1+2B2; Table 1) designed based on the previously determined VHII gene sequence (accession number FM877013; ref. 10). PCR products of 0.7 kb were obtained for each animal and sequenced.

Reverse transcription and real-time PCR

cDNA was reverse transcribed from 1 μg of spleen RNA using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a final volume of 20 μl. The AID-, NF-κB-, and GAPDH-specific primers were designed using the Genscript software (http://www.genscript.com; Table 1). Each primer was designed across a junction between 2 exons to ensure that it could not hybridize to potential traces of genomic DNA. Real-time PCRs were performed in the Realplex2S Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), as described previously (12). Each reaction contained 15 ng of cDNA except for that with the GAPDH primers, for which 1.5 ng of cDNA was used. The cycling protocol was as follows: 5 min at 94°C and then 41 cycles of 15 s at 94°C and 45 s at the annealing temperature indicated in Table 1. PCR efficiencies ranged from 96 to 108%. PCRs were performed in triplicate and repeated ≥3 times. The equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to calculate the relative expression of AID, p100, p105, RelA, and RelB in comparison to GAPDH.

RESULTS

Somatic hypermutation in *P. waltl*

Before studying somatic hypermutation, we sequenced the VHII gene used to build specific IgM heavy chains for each animal involved in this study to take into account potential polymorphism. We studied IgM because it is the most abundant isotype in *P. waltl*, and class switching is absent in urodeles (12, 13). The analysis of the obtained sequences shows that serine codons are not randomly distributed along the VHII gene (**Fig. 1**). AGC and AGT serine codons are concentrated in or near CDR regions, while TCN (N=A, C, G, or T) codons are located in framework regions and leader peptides. This bias exists in all jawed vertebrates (14) and has been selected during evolution because AGC and AGT codons are frequent targets of SHM. This bias emphasizes the importance of evolving and maintaining hypermutable V genes.

To detect SHM, we aligned cDNAs containing VHII-D-JH rearrangements associated with Cμ with the corresponding VHII germline sequence for each *P. waltl*. Figure 1 presents the topography of point mutations along the VHII domain from the leader peptide to the beginning of CDR3. We did not analyze CDR3 because, as in mammals, these regions contain the VH-D and D-JH junctions and are, therefore, highly variable. Forty-six mutated bases were detected (40 in immunized and 6 in unimmunized animals; Figs. 1 and **2**). Sixty-five percent of these point mutations induced a change in the amino acid. Only 1 mutation generated a stop codon. There were 0 to 4 point mutations/sequence. Neither deletions nor insertions were observed. Transitions were more frequent than transversions (Fig. 2), as previously observed in mammals and the anouran amphibian *X. laevis* (3, 15). In the 4 immunized animals, mutations were not concentrated in the CDR1 and CDR2 regions, as was previously reported in *X. laevis* IgM VH domains (15), thereby suggesting that they are not selected during the immune response. This observation is attributed to the lack of germinal centers in ectotherms, as confirmed recently by *in situ* hybridization experiments performed on *Xenopus* spleen sections (16).

To ensure that the nucleotide substitutions detected in this study were SHM and not *Taq* polymerase errors, a clone containing a VHII-D-JH rearrangement associated with Cμ was arbitrarily selected and subjected to 50 rounds of PCR using the conditions that were used for the construction of the VH-Cμ cDNA libraries. The resulting PCR products were cloned, and representative products were sequenced. These results identified 12 mutations within the sequenced 12,154 bases (**Table 2**). Our *Taq* polymerase error rate was therefore 0.2×10^{-4} errors/bp/cycle, which is consistent with the *Taq* error rate found by others (17).

Table 2 presents the number, the nature, and the frequencies of the observed mutations. It shows that the results obtained from animals treated with the same conditions are similar, as indicated by values of $P = 0.749$, 0.725, 0.668, and 0.616. This coherence of data in animal pairs has been observed in 2 other studies (9, 10) and is attributed to inbreeding (see also Materials and Methods). Furthermore, these results indicate that the A:T mutations observed in animals immunized on Earth or in space were generated by the *Taq* polymerase. As in *X. laevis* (15), only G:C mutations were induced by the antigenic challenge, as indicated by a value of $P = 0.002$ when we compared Earth-immunized and unimmunized animals. This conclusion is confirmed by the fact that 68.4% of G:C mutations observed in immunized *P. waltl* affected GC and CT dinucleotides, which are part of the RGYW/WRCY (R=A or G; Y= C or T; W= A or T) motif defined as the principal hotspot for AID-induced G:U lesions. However, the frequency of these mutations was lower when *P. waltl* were immunized in the space station.

AID and NF-κB mRNA quantifications

To find potential causes of this decrease of SHM frequency under spaceflight conditions, we cloned and sequenced fragments of *P. waltl* NF-κB (p100, p105, RelA, and RelB) transcripts to allow the definition of specific primers to quantify by real-time PCR these mRNAs and the one of AID in the spleen of S1R, S4R, V3R, and V4R. We studied the expression of AID because it is the major effector of somatic hypermutation (18). We studied the expression of NF-κB to determine whether the decrease of SHM frequency results from an alteration of B-cell activation under spaceflight conditions. Indeed, this family of transcription factors constitutes a key signaling pathway in

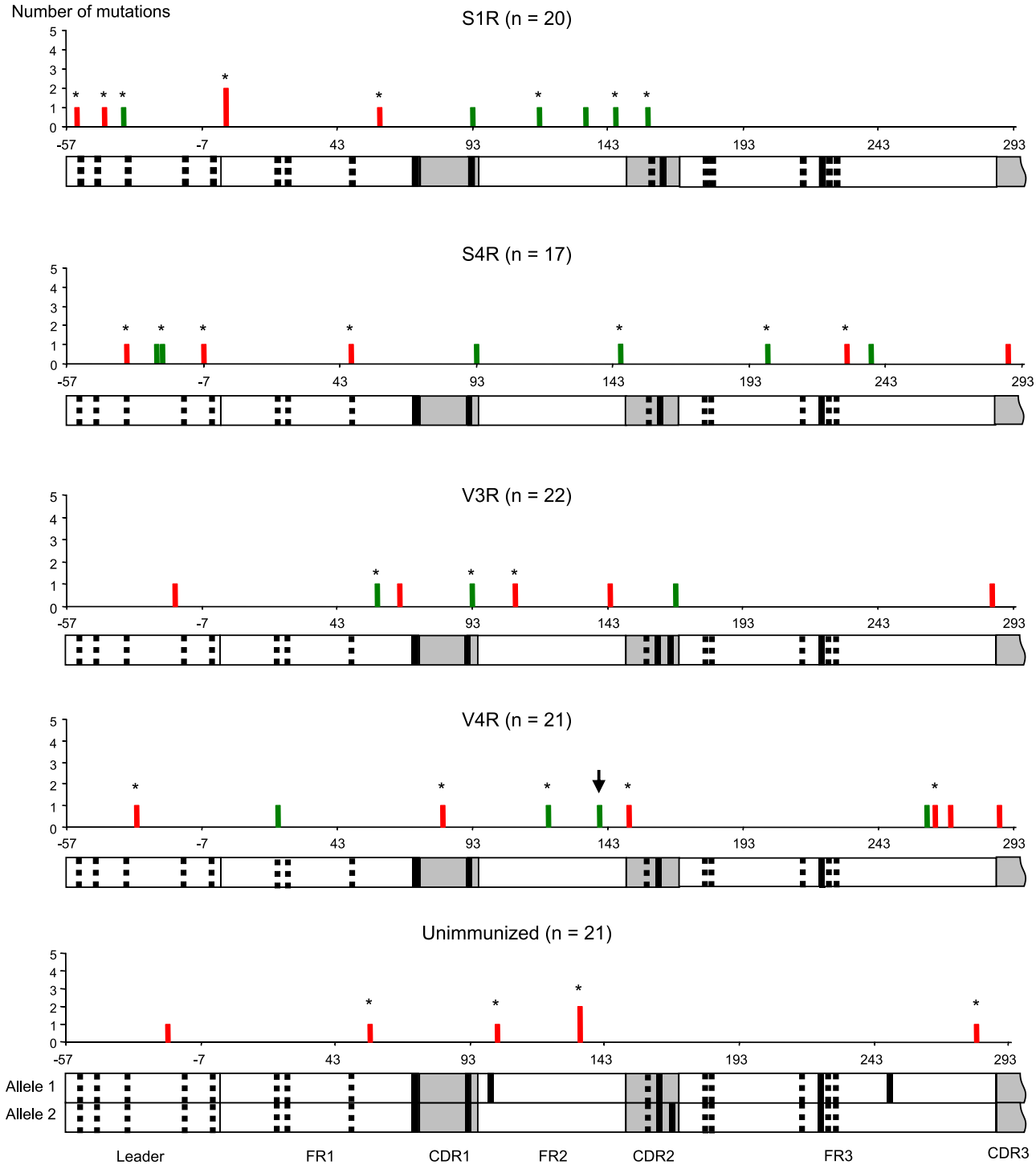


Figure 1. Topography of point mutations in the VHII domains of animals immunized on Earth (S1R and S4R) or in space (V3R and V4R) and unimmunized animals. Number of analyzed sequences is indicated in parentheses. Vertical lines show the positions and frequencies of A:T mutations in red and G:C mutations in green. Asterisks indicate mutations that change the amino acid sequence. Arrow locates the only point mutation that induces a stop codon. CDR3 is represented after sequence diversity due to VDJ recombination. Dotted and continuous vertical lines in the VHII domains represent the AGC/T and TCN serine codons, respectively.

antigen receptor-driven B-cell activation (19). Unfortunately, because of the small sample size, in the comparison of gene expression of animals in space *vs.* Earth, all of the *P* values are large (0.333 to 1.0; **Fig. 3**), thereby preventing the identification of the cause of this decrease in SHM frequency.

DISCUSSION

SHM frequency in amphibians

In this study, we calculated a hypermutation rate of 9.25×10^{-4} mutations/bp for *P. waltl* hyperimmunized

S1R (n = 20)

From \ To	A	T	C	G	Total
A	-			**2**	2
T		-	**3**		3
C	1	**2**	-	1	4
G	**1**		1	-	2

73% transitions
27% transversions

S4R (n = 17)

From \ To	A	T	C	G	Total
A	-			**2**	2
T		-	**2**	**1**	3
C	1	**3**	-		4
G	**1**		1	-	2

73% transitions
27% transversions

V3R (n = 22)

From \ To	A	T	C	G	Total
A	-			**2**	2
T		-	**3**		3
C	2	**1**	-		3
G				-	0

75% transitions
25% transversions

V4R (n = 21)

From \ To	A	T	C	G	Total
A	-	1	1	**1**	3
T		-	**3**		3
C		**1**	-		1
G	**3**			-	3

80% transitions
20% transversions

Unimmunized (n = 21)

From \ To	A	T	C	G	Total
A	-			**3**	3
T		-	**3**		3
C			-		0
G				-	0

100% transitions
0% transversions

Figure 2. Mutation profiles in VHII domains of Earth-immunized (S1R and S4R), space-immunized (V3R and V4R), and unimmunized animals. Numbers in bold correspond to transitions. Number of analyzed sequences is indicated in parentheses.

on Earth (Table 2). The analysis of somatic hypermutation in *X. laevis* hyperimmunized with DNP-KLH showed a hypermutation rate of 6.2×10^{-4} mutations/bp in VH domains of IgM produced in response to the antigen (15). This frequency is lower than that calculated for *P. waltl*, likely because the durations of the hyperimmunization protocols were different in the two studies (28 d for *X. laevis* and 5 mo for *P. waltl*). Moreover, the rate of somatic hypermutation in mammals has been estimated to be 10^{-3} bp/generation. A comparison of this value with the frequency of somatic mutations determined in this study, 9.25×10^{-4} mutations/bp, suggests that the immunization of *P. waltl* induced only 1 generation of B lymphocytes. This hypothesis is supported by the fact that we did not detect clonal expansion in the 4 immunized *P. waltl* and may at least partially explain why affinity maturation is lowest in these species when compared with mammals.

Origin of the G:C bias in ectotherms

Our results indicate that somatic hypermutation targets G:C bases in *P. waltl* IgM, as it does in *Xenopus*, fish, and shark IgM heavy chains (15, 17, 20). However, nurse shark antigen receptor (NAR) and shark Ig light chains do not present this bias (7, 21), suggesting that 2 SHM mechanisms appeared in cartilaginous fishes: one that targets G and C bases and is used by other ectotherms, and another that targets all 4 bases and is used by endotherms (**Fig. 4**). The G:C bias observed in ectotherms is unlikely to be due to a lack of selection, as could be suggested by the absence of germinal centers

TABLE 2. *Mutation frequencies*

Condition and animal	Sequenced nucleotides (*n*)	Number and nature of mutations	A:T frequency ($\times 10^{-4}$/bp)	*P* value	G:C frequency ($\times 10^{-4}$/bp)	*P* value
IE						
S1R	7,016	11; 5 A:T + 6 G:C	7.13	0.749 *vs.* S4R	8.55	0.725 *vs.* S4R
S4R	5,958	11; 5 A:T + 6 G:C	8.39		10.07	
Total IE	12,974	22; 10 A:T + 12 G:C	7.71	0.910 *vs.* NI	9.25[a]	0.002 *vs.* NI[a]
IS						
V3R	7,695	8; 5 A:T + 3 G:C	6.50	0.668 *vs.* V4R	3.90	0.616 *vs.* V4R
V4R	7,367	10; 6 A:T + 4 G:C	8.14		5.43	
Total IS	15,062	18; 11 A:T + 7 G:C	7.30	0.827 *vs.* NI	4.65[a]	0.031 *vs.* NI[a]
NI	7,350	6; 6 A:T + 0 G:C	8.16	0.978 *vs.* PCR	0.00	0.199 *vs.* PCR
PCR errors	12,154	12; 10 A:T + 2 G:C	8.23		1.65	

IE, immunized on Earth; IS, immunized in space; NI, not immunized. Values of *P* calculated by $\chi 2$ test. [a]Somatic hypermutation.

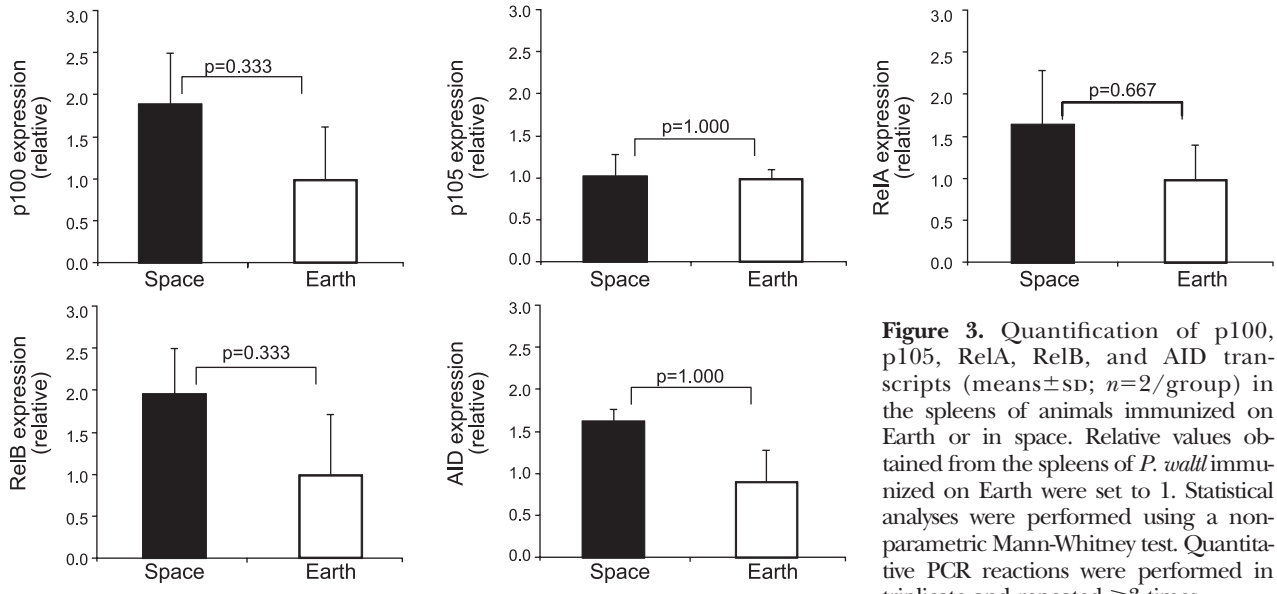


Figure 3. Quantification of p100, p105, RelA, RelB, and AID transcripts (means±SD; $n=2$/group) in the spleens of animals immunized on Earth or in space. Relative values obtained from the spleens of *P. waltl* immunized on Earth were set to 1. Statistical analyses were performed using a nonparametric Mann-Whitney test. Quantitative PCR reactions were performed in triplicate and repeated ≥3 times.

in these species, because it was shown that the pattern of mutations in passenger Ig transgenes, the heavy-chain intron, non-Ig sequences placed within an Ig construct and nonproductively rearranged Ig genes, do not display a G:C bias (25–28). Furthermore, lymphotoxin-α-deficient mice, which do not form germinal centers, undergo SHM without a G:C bias (29).

Mice deficient for polymerase η, MSH2, MSH2 + polymerase η, UNG + MSH2, or UNG + MSH6 present a strong bias for G:C mutations (30–32). However, the G:C bias observed in ectotherms is unlikely to be due to the absence of one or several effectors of the SHM machinery because our searches of existing databases demonstrated that the molecules known or suspected to be involved in the SHM process (AID, UNG, MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, Rev1, Rev3, Pol η, Pol ι, Pol θ, Exo1, Apex2, DNA-PKc, Ku70, Ku80, and PCNA) can be traced to bony fish. Because shark B cells coexpress IgM heavy and light chains, we speculate that small modifications of SHM effectors in ectotherms may be responsible for this G:C bias by changing their interaction with the DNA target. For example, it was shown that the replacement of K164 by R in PCNA induces a >90% reduction in mutations at A:T bases (33). This mutation is not observed in *Danio rerio* and *X. laevis* PCNA but illustrates the effect that point mutations could have.

Similarities with human marginal zone B cells

Patients with hyper IgM syndrome (HIGM) due to a CD40 or CD40L genetic deficiency cannot switch Ig isotypes and do not form germinal centers, two characteristics also seen in *P. waltl*. However, $IgM^+IgD^+CD27^+$ splenic marginal zone (SMZ) B cells with somatically mutated Ig receptors are present in these patients. Human SMZ B cells develop and diversify their Ig receptors by SHM during the first years of life in an Ag-independent context (reviewed in ref. 34). Interestingly, AID transcripts were detected very early during *P. waltl* and *X. laevis* ontogeny, suggesting that AID could be involved in an Ag-independent process in these species (12, 16). Furthermore, frequencies of somatic hypermutation of 10^{-2} and 0.4×10^{-2} mutations/bp were detected in SMZ B cells of adults with HIGM and children <2 yr of age, respectively. This is only 10 or 4 times higher than the SHM frequency observed in this work (Table 2). Consequently, it seems reasonable to propose that somatic hypermutations observed in this study were generated by SMZ-like B cells and that some of these cells were still present in adult *P. waltl* spleens, as suggested by the presence of AID expression in that tissue despite the absence of germinal centers (12).

Effect of spaceflight on antibody somatic hypermutation

Numerous logistical and technological hurdles exist when performing biological spaceflight experiments (*e.g.*, for technical reasons we could not use rodents for the Genesis experiment, and sample sharing with other investigators induced a delay in tissue fixation after landing). Moreover, a limited number of opportunities to conduct such research are available, and these experiments are extremely expensive. Therefore, even when low numbers of samples are recovered from a space experiment, they deserve to be studied. V3R and V4R were the only available animals in which the effect of the extreme conditions encountered during spaceflight on antibody somatic hypermutation could be studied. Their analysis revealed that the frequency of SHM drops from 9.25×10^{-4} to 4.65×10^{-4} mutations/bp under spaceflight conditions (Table 2). This decrease is not due to a decrease in food intake, which is often observed during spaceflight and is known to affect immune functions, since V3R and V4R were force-fed and consequently had only a 4–5% lower body mass at landing compared with S1R and S4R. Furthermore, it was shown that Ag/BCR binding (35)

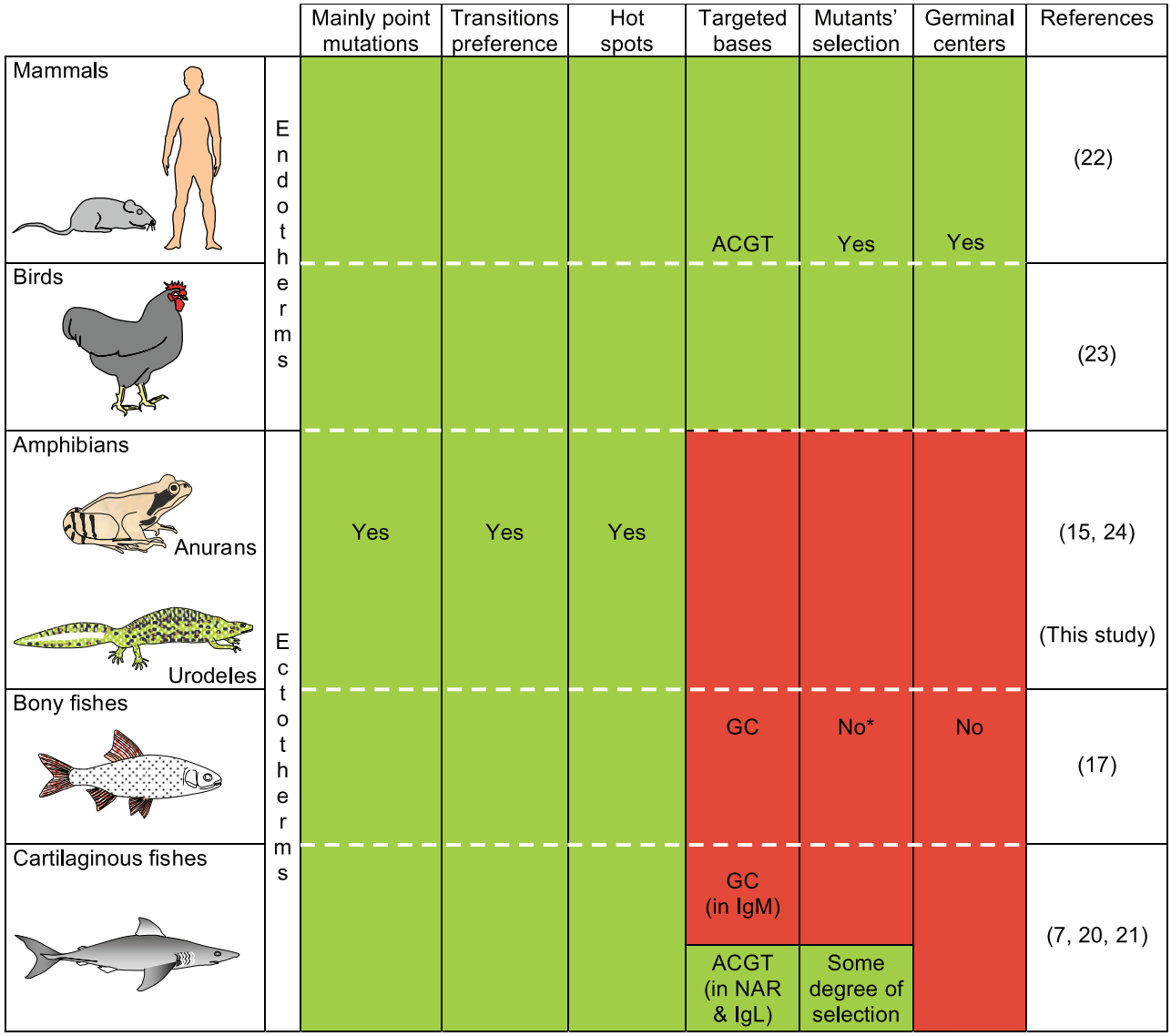


Figure 4. Characteristics of somatic hypermutation in jawed vertebrates, as deduced from the literature and from this study. Reptiles are not included due to the lack of available information for these species. Row 5 shows that SHM targets G and C bases in shark IgM and all 4 bases in nurse shark antigen receptor (NAR) and Ig light chains, suggesting that 2 SHM mechanisms appeared in cartilaginous fishes. *No selection or selection much less efficient than in mammals.

and the interaction between the TCR/CD3 complex and antigenic peptides presented by MHC molecules (36) are not affected by microgravity, thereby ruling out the possibility that this decrease in SHM frequency results from perturbations of these interactions. SHM frequency is diminished by half in IgM of germinal center-associated nuclear protein (GANP)-knockout mice (37). Consequently, we isolated a fragment of *P. waltl* GANP mRNA and studied its expression. These experiments (data not shown) indicate that the decrease in SHM frequency under spaceflight conditions is not due to the absence of this factor, because we could amplify its transcript using splenic cDNA from flown animals. We believe that the decrease in SHM frequency results from the combination of several changes observed after exposure to altered gravity. The most significant ones are the strong inhibition (≥90%) of T-cell activation (38, 39), which would considerably reduce the efficiency of T-cell help; severe perturbations of the cytoskeleton (40–42), which would affect signal transduction (39, 43–45) and cell motility (46); changes in the distribution of lymphocyte subpopulations (47–51) brought about by fluid shifts in microgravity (52); changes in adhesion molecule expression (53–55), which could affect cognate T-B collaboration and the rescue of B cells expressing higher affinity antibodies by positive selection; and cytokine (51, 56–58) and gene (59–61) expression modifications. These changes, often reported after spaceflight in mammals and mammalian cells, probably occurred in parallel within the spleens of our flown animals and could have affected the activation of B lymphocytes and the expression of AID. To test these hypotheses, we quantified the expression of NF-κB (p100, p105, RelA, and RelB)

genes, along with AID, in the spleen of S1R, S4R, V3R, and V4R. Unfortunately, because of the small sample size, these quantifications did not allow conclusions about the cause of this decrease in SHM frequency (Fig. 3). Moreover, the lack of differentiation between space- and Earth-immunized animals could also be explained by the fact that, to allow sample sharing, we had to wait 10 d after landing before the animals were killed, thereby allowing their mRNA levels to return to normal. Note that the decrease in SHM frequency in flown animals was still visible 10 d after landing, because somatic hypermutations are introduced into genomic DNA.

Because SHM is the first step in antibody affinity maturation, the observed decrease in SHM frequency could perhaps reduce antibody affinities. Consequently, it will be important to repeat the immunization of animals onboard a space station and measure the affinities of in-flight-generated antibodies. It will also be necessary to fix samples before or as soon as possible after landing to determine why SHM frequency is affected by these environmental conditions. Finally, in addition to the 5 markers tested in this study, another potential mechanism that deserves investigation is the instability of cells due to microgravity-induced apoptosis (62) and/or impaired efficiency of DNA repair (63).

In conclusion, many SHM features are conserved in *P. waltl*. Furthermore, molecules involved in the SHM process are conserved from mammals to bony fishes. Thus, the reduction in SHM frequency observed when *P. waltl* were immunized under spaceflight conditions is perhaps applicable to mammals. However, further in-flight experiments will be required to determine the causes of this decrease. Experiments will also be required in mammals, because the SHM mechanism of amphibians presents a G:C bias and is, therefore, somewhat different. Finally, there would be value in analysis of SHM in humans exposed to other extreme conditions (for example Antarctic expeditioners and people living in an enclosed environment for prolonged periods, such as submariners). FJ

The authors thank the French cosmonaut J.-P. Haigneré for performing the Genesis experiment onboard the Mir space station; Prof. A. Dalloul for critical reading and suggestions; our Russian colleagues for the preparation of the space mission; and the French National Space Agency (CNES), the National Research Agency (ANR NT09-632666), the French Ministry of Higher Education and Research, and the University of Nancy for financial support.

REFERENCES

1. Gellert, M. (2002) V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **71,** 101–132
2. Maul, R. W., Saribasak, H., Martomo, S. A., McClure, R. L., Yang, W., Vaisman, A., Gramlich, H. S., Schatz, D. G., Woodgate, R., Wilson, D. M., 3rd, and Gearhart, P. J. (2011) Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions. *Nat. Immunol.* **12,** 70–76
3. Di Noia, J. M., and Neuberger, M. S. (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* **76,** 1–22
4. Flajnik, M. F., and Kasahara, M. (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* **11,** 47–59
5. Criscitiello, M. F., and Flajnik, M. F. (2007) Four primordial immunoglobulin light chain isotypes, including λ and κ, identified in the most primitive living jawed vertebrates. *Eur. J. Immunol.* **37,** 2683–2694
6. Litman, G. W., Rast, J. P., and Fugmann, S. D. (2010) The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10,** 543–553
7. Lee, S. S., Tranchina, D., Ohta, Y., Flajnik, M. F., and Hsu, E. (2002) Hypermutation in shark immunoglobulin light chain genes results in contiguous substitutions. *Immunity* **16,** 571–582
8. Konstantinova, I. V., Rykova, M. P., Lesnyak, A. T., and Antropova, E. A. (1993) Immune changes during long-duration missions. *J. Leukoc. Biol.* **54,** 189–201
9. Boxio, R., Dournon, C., and Frippiat, J.-P. (2005) Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Appl. Physiol.* **98,** 905–910
10. Bascove, M., Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Tschirhart, E., and Frippiat, J. -P. (2009) Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J.* **23,** 1607–1615
11. Guéguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J. -L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C., and Frippiat, J. -P. (2009) Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J. Leukoc. Biol.* **86,** 1027–1038
12. Bascove, M., and Frippiat, J. -P. (2010) Molecular characterization of *Pleurodeles waltl* activation-induced cytidine deaminase. *Mol. Immunol.* **47,** 1640–1649
13. Schaerlinger, B., Bascove, M., and Frippiat, J. -P. (2008) A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. *Mol. Immunol.* **45,** 776–786
14. Wagner, S. D., Milstein, C., and Neuberger, M. S. (1995) Codon bias targets mutation. *Nature* **376,** 732
15. Wilson, M., Hsu, E., Marcuz, A., Courtet, M., Du Pasquier, L., and Steinberg, C. (1992) What limits affinity maturation of antibodies in *Xenopus*–the rate of somatic mutation or the ability to select mutants? *EMBO J.* **11,** 4337–4347
16. Marr, S., Morales, H., Bottaro, A., Cooper, M., Flajnik, M., and Robert, J. (2007) Localization and differential expression of activation-induced cytidine deaminase in the amphibian *Xenopus* upon antigen stimulation and during early development. *J. Immunol.* **179,** 6783–6789
17. Yang, F., Waldbieser, G. C., and Lobb, G. J. (2006) The nucleotide targets of somatic mutation and the role of selection in immunoglobulin heavy chains of a teleost fish. *J. Immunol.* **176,** 1655–1667
18. Martin, A., Bardwell, P. D., Woo, C. J., Fan, M., Shulman, M. J., and Scharff, M. D. (2002) Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature* **415,** 802–806
19. Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **27,** 693–733
20. Hinds-Frey, K. R., Nishikata, H., Litman, R. T., and Litman, G. W. (1993) Somatic variation precedes extensive diversification of germline sequences and combinatorial joining in the evolution of immunoglobulin heavy chain diversity. *J. Exp. Med.* **178,** 815–824
21. Diaz, M., Velez, J., Singh, M., Cerny, J., and Flajnik, M. F. (1999) Mutational pattern of the nurse shark antigen receptor gene (NAR) is similar to that of mammalian Ig genes and to spontaneous mutations in evolution: the translesion synthesis model of somatic hypermutation. *Int. Immunol.* **11,** 825–833
22. Milstein, C., Neuberger, M. S., and Staden, R. (1998) Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 8791–8794
23. Parvari, R., Ziv, E., Lantner, F., Heller, D., and Schechter, I. (1991) Somatic diversification of chicken immunoglobulin light chains by point mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87,** 3072–3076
24. Wilson, M., Marcuz, A., and Du Pasquier, L. (1995) Somatic mutations during an immune response in *Xenopus* tadpoles. *Dev. Immunol.* **4,** 227–234

25. Betz, A. G., Rada, C., Pannel, R., Milstein, C., and Neuberger, M. S. (1993) Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90,** 2385–2388
26. Gonzalez-Fernandez, A., Gupta, S. K., Pannel, R., Neuberger, M. S., and Milstein, C. (1994) Somatic mutation of immunoglobulin lambda chains: a segment of the major intron hypermutates as much as the complementarity-determining regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91,** 12614–12618
27. Yelamos, J., Klix, N., Goyencchca, B., Lozano, F., Chui, Y. L., Gonzalez-Fernandez, A., Pannell, R., Neuberger, M. S., and Milstein, C. (1995) Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature* **376,** 225–229
28. Dorner, T., Brezinscheck, H. P., Brezinscheck, R. I., Foster, S. J., Domiati-Saad, R., and Lipsky, P. E. (1997) Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations with non-productively rearranged human variable chain genes. *J. Immunol.* **158,** 2779–2789
29. Matsumoto, M., Lo, S. F., Carruthers, C. J., Min, J., Mariathasan, S., Huang, G., Plas, D. R., Martin, S. M., Geha, R. S., Nahm, M. H., and Chaplin, D. D. (1996) Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *Nature* **383,** 462–466
30. Rada, C., Di Noia, J. M., and Neuberger, M. S. (2004) Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol. Cell.* **16,** 163–171
31. Shen, H. M., Tanaka, A., Bozek, G., Nicolae, D., and Storb, U. (2006) Somatic hypermutation and class switch recombination in Msh6(-/-)Ung(-/-) double-knockout mice. *J. Immunol.* **15,** 5386–5392
32. Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J. C., and Reynaud, C. A. (2007) DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J. Exp. Med.* **204,** 17–23
33. Langerak, P., Nygren, A. O., Krijger, P. H., van den Berk, P. C., and Jacobs, H. (2007) A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification. *J. Exp. Med.* **204,** 1989–1998
34. Weill, J. C., Weller, S., and Reynaud, C. A. (2009) Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27,** 267–285
35. Maule, J., Fogel, M., Steele, A., Wainwright, N., Pierson, D. L., and McKay, D. S. (2003) Antibody binding in altered gravity: implications for immunosorbent assay during space flight. *J. Gravit. Physiol.* **10,** 47–55
36. Cogoli-Greuter, M., Lovis, P., and Vadrucci, S. (2004) Signal transduction in T cells: an overview. *J. Gravit. Physiol.* **11,** 53–56
37. Kuwahara, K., Fujimura, S., Takahashi, Y., Nakagata, N., Takemori, T., Aizawa, S., and Sakaguchi, N. (2004) Germinal center-associated nuclear protein contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor in T cell-dependent responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 1010–1015
38. Cogoli, A., Tschopp, A., and Fuchs-Bislin, P. (1984) Cell sensitivity to gravity. *Science* **225,** 228–230
39. Pippia, P., Sciola, L., Cogoli-Greuter, M., Meloni, M. A., Spano, A., and Cogoli, A. (1996) Activation signals of T lymphocytes in microgravity. *J. Biotechnol.* **47,** 215–222
40. Lewis, M. L., Reynolds, J. L., Cubano, L. A., Hatton, J. P., Lawless, B. D., and Piepmeier, E. H. (1998) Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J.* **12,** 1007–1018
41. Hughes-Fulford, M. (2003) Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. *Adv. Space Res.* **32,** 1585–1593
42. Meloni, M. A., Galleri, G., Pippia, P., and Cogoli-Greuter, M. (2006) Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modelled low gravity. *Protoplasma* **229,** 243–249
43. Janmey, P. A. (1998) The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* **78,** 763–781
44. Hashemi, B. B., Penkala, J. E., Vens, C., Huls, H., Cubbage, M., and Sams, C. F. (1999) T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and in spaceflight. *FASEB J.* **13,** 2071–2082
45. Boonyaratanakornkit, J. B., Cogoli, A., Li, C. F., Schopper, T., Pippia, P., Galleri, G., Meloni, M. A., and Hughes-Fulford, M. (2005) Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J.* **19,** 2020–2022
46. Meloni, M. A., Galleri, G., Pani, G., Saba, A., Pippia, P., and Cogoli-Greuter, M. (2011) Space flight affects motility and cytoskeletal structures in human monocyte cell line J-111. *Cytoskeleton* **68,** 125–137
47. Ichiki, A. T., Gibson, L. A., Jago, T. L., Strickland, K. M., Johnson, D. L., Lange, R. D., and Allebban, Z. (1996) Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.* **60,** 37–43
48. Sonnenfeld, G., Mandel, A. D., Konstantinova, I. V., Berry, W. D., Taylor, G. R., Lesnyak, A. T., Fuchs, B. B., and Rakhmilevich, A. L. (1992) Spaceflight alters immune cell function and distribution. *J. Appl. Physiol.* **73,** 191S–195S
49. Pecaut, M. J., Nelson, G. A., Peters, L. L., Kostenuik, P. J., Bateman, T. A., Morony, S., Stodieck, L. S., Lacey, D. L., Simske, S. J., and Gridley, D. S. (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. I. Immune population distributions. *J. Appl. Physiol.* **94,** 2085–2094
50. Gridley, D. S., Slater, J. M., Luo-Owen, X., Rizvi, A., Chapes, S. K., Stodieck, L. S., Ferguson, V. L., and Pecaut, M. J. (2009) Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J. Appl. Physiol.* **106,** 194–202
51. Baqai, F. P., Gridley, D. S., Slater, J. M., Luo-Owen, X., Stodieck, L. S., Ferguson, V., Chapes, S. K., and Pecaut, M. J. (2009) Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *J. Appl. Physiol.* **106,** 1935–1942
52. Vernikos, J. (1996) Human physiology in space. *Bioessays* **18,** 1029–1037
53. Grove, D. S., Pishak, S. A., and Mastro, A. M. (1995) The effect of a 10-day space flight on the function, phenotype, and adhesion molecule expression of splenocytes and lymph node lymphocytes. *Exp. Cell Res.* **219,** 102–109
54. Stowe, R. P., Sams, C. F., Mehta, S. K., Kaur, I., Jones, M. L., Feeback, D. L., and Pierson, D. L. (1999) Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* **65,** 179–186
55. Tian, J., Pecaut, M. J., Slater, J. M., and Gridley, D. S. (2010) Spaceflight modulates expression of extracellular matrix, adhesion, and profibrotic molecules in mouse lung. *J. Appl. Physiol.* **108,** 162–171
56. Gould, C. L., Lyte, M., Williams, J. A., Mandel, A. D., and Sonnenfeld, G. (1987) Inhibition of interferon-gamma but normal interleukine-3 production from rats flown on the space shuttle. *Aviat. Space Environ. Med.* **58,** 983–986
57. Crucian, B. E., Cubbage, M. L., and Sams, C. F. (2000) Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. *J. Interferon Cytokine Res.* **20,** 547–556
58. Crucian, B. E., Stowe, R. P., Pierson, D. L., and Sams, C. F. (2008) Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviat. Space Environ. Med.* **79,** 835–843
59. Fitzgerald, J., and Hughes-Fulford, M. (1996) Gravitational loading of a simulated launch alters mRNA expression in osteoblasts. *Exp. Cell Res.* **228,** 168–171
60. Hughes-Fulford, M., Rodenacker, K., and Jütting, U. (2006) Reduction of anabolic signals and alteration of osteoblast nuclear morphology in microgravity. *J. Cell. Biochem.* **99,** 435–349
61. Lebsack, T. W., Fa, V., Woods, C. C., Gruener, R., Manziello, A. M., Pecaut, M. J., Gridley, D. S., Stodieck, L. S., Ferguson, V. L., and Deluca. D. (2010) Microarray analysis of spaceflown murine thymus tissue reveals changes in gene expression regulating stress and glucocorticoid receptors. *J. Cell. Biochem.* **110,** 372–381
62. Maccarrone, M., Battista, N., Meloni, M., Bari, M., Galleri, G., Pippia, P., Cogoli, A., and Finazzi-Agro, A. (2003) Creating conditions similar to those that occur during exposure of cells to microgravity induces apoptosis in human lymphocytes by 5-lipoxygenase-mediated mitochondrial uncoupling and cytochrome c release. *J. Leukoc. Biol.* **73,** 472–481
63. Mognato, M., Girardi, C., Fabris, S., and Celotti, L. (2009) DNA repair in modelled microgravity: double strand break rejoining activity in human lymphocytes irradiated with gamma-rays. *Mutat. Res.* **663,** 32–39

Received for publication March 21, 2011.
Accepted for publication May 5, 2011.

PARTIE 2

EFFETS D'UN VOL SPATIAL SUR LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME IMMUNITAIRE HUMORAL D'UN AMPHIBIEN

Une modification de la gravité affecte la transcription des chaînes lourdes d'IgM durant le développement

1. Introduction

Un vol spatial est source de nombreux stress, notamment la microgravité pendant le vol, l'hypergravité au décollage et à l'atterrissage, les radiations cosmiques, le confinement dans l'espace réduit des habitacles ou encore une perturbation du rythme circadien. Comme décrit dans la publication 1 de ce manuscrit, ces facteurs de stress ont des effets immunosuppresseurs. Les quelques études portant sur l'impact des vols spatiaux sur le système immunitaire humoral ont montré que des vols de courte durée n'induisait pas de modification quantitative des anticorps sériques chez l'homme (Voss, 1984 ; Stowe *et al.*, 1999 ; Rykova *et al.*, 2008). En revanche, des études menées chez l'homme sur des vols de longue durée ont montré des résultats contradictoires ; augmentation plasmatique (Konstantinova *et al.*, 1993) ou non (Rykova *et al.*, 2008) des IgA et des IgG. Chez l'animal, l'expérience Genesis menée en 1999 sur l'amphibien *Pleurodeles waltl* a pu mettre en évidence une augmentation des IgY (équivalent des IgA sécrétoires des mammifères) ; une utilisation différente des gènes VH pour produire les chaînes lourdes d'IgM (publication 2) ainsi qu'une baisse de la fréquence des hypermutations somatiques (publication 3) suite à une immunisation au cours des 5 mois de vol à bord de la station Mir.

Le travail présenté dans cette partie de ma thèse avait pour but de déterminer si la production d'anticorps est affectée lorsque le développement du système immunitaire de cet amphibien a lieu en vol à bord de l'ISS en 2006 (expérience AMPHIBODY menée sur des embryons de pleurodèle, **fig. 1 de la publication 4**). Les stress subis pendant ce vol ont également été recréés sur Terre de façon isolée (hypergravité à 3G, microgravité simulée dans une RPM (Random Positioning Machine), choc thermique associé à la réentrée dans l'atmosphère terrestre, radiations, confinement et perturbation du rythme circadien) afin de savoir quel(s) stress est (sont) responsable(s) d'une éventuelle modification de la production d'anticorps suite au vol spatial.

2. Taux de survie et taille des larves

Bien que des études précédentes ont montré que la microgravité affecte le développement embryonnaire précoce de *P. waltl* (Aimar *et al.*, 2000 ; Dournon, 2003), aucune modification dans la taille ni dans les taux de survie n'apparaît suite au vol spatial **(fig. 3 de la publication 4)**, ni suite à 10 jours d'hypergravité à 3G. Concernant le

développement des larves, l'équipe du Pr Horn (université d'Ulm, Allemagne) a étudié les réflexes vestibulo-occulaires de ces mêmes animaux et a pu observer une altération de ces réflexes 4 jours après l'atterrissage, qui est réversible au cours du temps puisque 20 jours plus tard, aucune différence n'est constatée. Ainsi, la gravité altérée n'a pas affecté la morphologie des animaux mais a pu provoquer un retard transitoire de développement de certaines fonctions.

3. Etude des transcrits codant les chaînes lourdes des IgM

Etant donné le stade de développement des larves à l'atterrissage, IgM est le seul isotype exprimé (Schaerlinger *et al.*, 2008). La quantification des transcrits codant les chaînes lourdes de ces IgM indique une augmentation significative chez les larves ayant séjourné 10 jours dans l'ISS, comparé au groupe de larves resté au sol, le jour de l'atterrissage. Cette augmentation est réversible au cours du temps puisque 25 jours après, plus aucune différence n'est constatée (**fig. 4 de la publication 4**). La **figure 5** de cette même publication montre les quantités de ces mêmes transcrits suite aux stress recrées sur Terre (hypergravité à 3G, microgravité simulée dans une RPM, radiations, perturbation du rythme circadien, choc thermique et confinement).

Les figures 4 et 5 montrent que seules les modifications de la gravité modifient le taux de transcription des IgM. Le profil d'expression des transcrits codant les chaînes lourdes d'IgM suit le « principe du continuum » qui suggère que la microgravité et l'hypergravité ont des effets opposés sur les paramètres biologiques (Wade, 2005).

L'absence d'effet du confinement était attendue car d'une part la densité de larves dans les aquariums envoyés dans l'ISS était la même que celle utilisée dans l'animalerie au sol et d'autre part car il a été montré que 240 jours de confinement n'affectent pas le nombre de LB ni de LT chez l'homme (Choukèr *et al.*, 2002).

Quant aux radiations, il est connu que les amphibiens y sont plus résistants que les mammifères (Blaustein & Belden, 2003), ce que nous avons confirmé avec la quantification des transcrits de la DNA-PKc et de la p38MAPK (**fig. 7 de la publication 4**).

Nous avons recréé le choc thermique associé au retour sur Terre du vaisseau Soyouz et avons ensuite quantifié les transcrits de 3 protéines de choc thermique (HSF1, HSP70 et HSP90, **fig. 2 de la publication 4**). Cette expérience démontre que ce choc thermique n'a pas été suffisant pour changer la transcription des gènes codant HSF1 et HSP90 et induire la transcription du gène codant HSP70. Ce « choc thermique » n'est donc pas non plus responsable de l'augmentation des transcrits de chaînes lourdes d'IgM.

Enfin, il n'est pas illogique de ne constater aucune différence dans la transcription des chaînes lourdes d'IgM suite à l'altération du rythme circadien puisque, bien que l'inhibition de la mélatonine (protéine impliquée dans le rythme circadien) perturbe la production des anticorps suite à une immunisation, cette même inhibition ne perturbe pas le taux basal d'anticorps (sans immunisation, Cernysiov *et al.*, 2010). Or dans cette étude, nous n'avons pas immunisé les animaux.

4. Etude de la lymphopoïèse

Davis *et al.* (1996) ou encore Plett *et al.* (2004) ont décrit une influence de la gravité sur la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Nous nous sommes donc demandé si la modification de transcription des chaînes lourdes d'IgM en vol pouvait résulter d'une perturbation de l'hématopoïèse. Pour cela, nous avons étudié deux marqueurs de la lymphopoïèse : Ikaros, un marqueur spécifique de la lymphopoïèse précoce (Molnár *et al.*, 1996) ainsi que CD3, marqueur spécifique des lymphocytes T (**fig. 6 de la publication 4)**. Les résultats obtenus mettent en évidence une tendence à l'augmentation des transcrits codant CD3 suite au séjour dans l'ISS, mais aucune différence suite à 10 jours d'hypergravité à 3G ou 10 jours passés en microgravité simulée dans la RPM. Ces résultats montrent que dans notre étude, la lymphopoïèse précoce et le développement des LT ne semble pas affectés par les changements de gravité, alors que le développement des LB pourrait l'être puisque nous avons observé une augmentation des transcrits de chaînes lourdes d'IgM. Cependant, le manque de marqueurs spécifiques de l'hématopoïèse précoce chez *P. waltl* limite très fortement cette étude.

5. Etude de la transduction du signal

La modification de la transcription des chaînes lourdes d'IgM suite à une modification de la gravité pourrait résulter d'une perturbation de l'activation des LB. Pour tester cette hypothèse, nous avons quantifié les transcrits de 4 membres de la famille NFκB car ils jouent un rôle majeur dans la transduction du signal des LB (**figure 7 de la publication 4**). Ces quantifications montrent une augmentation des transcrits de NFκB en hypergravité et une diminution de ces transcrits en microgravité. Le principe de continuum de gravité s'applique donc à nouveau. De plus, l'expression des transcrits de NFκB varie de la même manière que celle des chaînes lourdes d'IgM. Il est donc possible qu'il y ait une perturbation de l'activation des LB suite à une modification de la gravité. D'ailleurs, Boonyaratanakornkit *et al.* (2005) ont aussi observé, dans les cellules T en microgravité, une modification de la

transcription des membres de NFκB. Ces facteurs de transcription semblent donc bien sensibles à la gravité et pourraient être les responsables de la modification de la transcription des chaînes lourdes d'IgM dans notre étude. Cependant, nous n'avons pas étudié NFκB au niveau post transcriptionnel, or une modification de la transcription de ces facteurs n'induit pas forcément une modification dans la traduction ni dans l'activité de ces protéines. De plus, nous avons quantifié ces transcrits sur l'ensemble de l'organisme. Or NFκB intervient non seulement dans les cellules B, mais aussi dans une multitude d'autres types cellulaires. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que la modification dans la transcription des membres de NFκB observée ne soit pas la même dans toutes les cellules de l'organisme.

6. Conclusion

La modification de la gravité affecte la transcription des chaînes lourdes d'IgM chez le pleurodèle en cours de développement. Cette modification pourrait être étroitement liée à l'expression des membres de NFκB, mais cette hypothèse reste à être prouvée. L'étude de cellules B purifiées ainsi que de l'activité de facteurs de transcription sera nécessaire pour vérifier cette hypothèse, mais cela nécessitera l'utilisation d'un autre modèle animal sur lequel le développement des cellules B est mieux caractérisé.

PUBLICATION 4

Faseb Journal, sous presse

The FASEB Journal article fj.12-217547. Published online September 19, 2012.

Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis

Cécile Huin Schohn,*,† Nathan Guéguinou,*,† Véronique Schenten,* Matthieu Bascove,* Guillemette Gauquelin Koch,‡ Sarah Baatout,§,‖ Eric Tschirhart,† and Jean-Pol Frippiat*,[1]

*Department of Development and Immunogenetics, Lorraine University, Vandœuvre-lès-Nancy, France; †Life Sciences Research Unit, University of Luxembourg, Luxembourg; ‡French National Space Agency (CNES), Paris, France; §Belgian Nuclear Research Centre (SCK · CEN), Mol, Belgium; and ‖Department for Molecular Biotechnology, Ghent University, Ghent, Belgium

ABSTRACT **Our previous research demonstrated that spaceflight conditions affect antibody production in response to an antigenic stimulation in adult amphibians. Here, we investigated whether antibody synthesis is affected when animal development occurs onboard a space station. To answer this question, embryos of the Iberian ribbed newt, *Pleurodeles waltl*, were sent to the International Space Station (ISS) before the initiation of immunoglobulin heavy-chain expression. Thus, antibody synthesis began in space. On landing, we determined the effects of spaceflight on *P. waltl* development and IgM heavy-chain transcription. Results were compared with those obtained using embryos that developed on Earth. We find that IgM heavy-chain transcription is doubled at landing and that spaceflight does not affect *P. waltl* development and does not induce inflammation. We also recreated the environmental modifications encountered by the embryos during their development onboard the ISS. This strategy allowed us to demonstrate that gravity change is the factor responsible for antibody heavy-chain transcription modifications that are associated with NF-κB mRNA level variations. Taken together, and given that the larvae were not immunized, these data suggest a modification of lymphopoiesis when gravity changes occur during ontogeny.—Schohn, C. H., Guéguinou, N., Schenten, V., Bascove, M., Koch, G. G., Baatout, S., Tschirhart, E., Frippiat, J.-P. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB J.* 27, 000–000 (2013). www.fasebj.org**

Key Words: humoral immune system · antibody · B lymphocyte

Spaceflight subjects an organism consistently or intermittently to a myriad of stresses, including microgravity, hypergravity forces during launch and landing, increased radiation, confinement, and disruption of the circadian rhythm. These factors affect the immune system and could compromise defenses against infections (reviewed in ref. 1). Indeed, astronauts live in a closed environment and have experienced altered immune function and increased vulnerability to infections during spaceflights dating back to the Apollo and Skylab missions (2). The alteration of the immune system is therefore an area that should be considered more thoroughly before prolonged space missions, such as would be encountered in the exploration of the surfaces of Mars, Phobos, Deimos, or some asteroids (3), are undertaken to ensure the long-term survival of individuals visiting space stations.

Up to now, studies regarding spaceflight-induced immune dysfunctions focused on innate immunity and T-cell responses. Conversely, humoral immunity and antibodies, despite their important functions, have rarely been investigated. The few studies addressing these aspects did not reveal significant changes in plasma antibody levels after short spaceflights (4–6); however, contradictory results were reported after long missions. Indeed, Konstantinova *et al.* (7) reported increased levels of serum immunoglobulin, particularly total IgA and IgG, whereas Rykova *et al.* (5) reported normal amounts of IgA, IgG, and IgM antibodies after prolonged space missions. To understand how the humoral immune response is affected by spaceflight conditions, we performed the Genesis space experiment using adult *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) as a model. The analysis of these animals revealed that spaceflight affects the antibody production in response to an antigenic stimulation. Indeed, the expression of IgY heavy chains (the counterpart of mammalian IgA molecules) was increased in *P. waltl* (8) that were flown, as previously observed in cosmonauts that had been in space for extended periods of time (7). Furthermore, the use of the different *VH* gene subgroups (8) and the expression of individual *VH* genes (9) were observed to be modified under spaceflight conditions. In addition, we recently demonstrated that somatic hypermutations,

Abbreviations: BOTEX, Botany Experiment; ESA, European Space Agency; HSF, heat-shock factor; HSP, heat-shock protein; ISS, International Space Station; LET, linear energy transfer; qPCR, quantitative PCR; RPM, random positioning machine; SCK · CEN, Belgian Nuclear Research Centre; rVOR, roll-induced vestibuloocular reflex

[1] Correspondence: Lorraine University, Faculty of Medicine, Development and Immunogenetics, JE 2537, 9 Ave. de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. E-mail: jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr

doi: 10.1096/fj.12-217547

which diversify antibody binding sites to improve their affinity, occur in space after immunization but at a lower frequency (10).

To further improve our knowledge of spaceflight-induced humoral immune system alterations, we performed a second space experiment, Amphibody, to determine whether antibody synthesis is affected when animal development occurs in a space station and, if so, which spaceflight-associated factor has the greatest effect. To address this question in the simplest way, we used embryos of anamniotes, such as amphibians. Two groups of *P. waltl* embryos were sent to the International Space Station (ISS) before first immunoglobulin heavy-chain expression so that antibody synthesis began in space. One group was exposed to microgravity in flight (F_{0g} group), whereas the other was centrifuged at 1 *g* in the ISS to mimic Earth's gravity (F_{1g} group). A third group of embryos developed on Earth for comparison (ground-based control, G_{1g} group). We also recreated the environmental modifications encountered by the embryos during their development in the ISS. These experiments demonstrate that gravity changes during ontogeny modify IgM transcription and probably lymphopoiesis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

P. waltl was used as a model because its rate of development was congruent with the duration of the spaceflight opportunity offered by the European Space Agency (ESA), and the cardinal elements of the adaptive immune system are shared by all gnathostomes (11). We used *P. waltl* embryos and larvae at stages 19–20 (3 d after laying) and 36–37 (14 d after laying) of development, respectively, as defined by Gallien and Durocher (12). Animals were reared in the Lorraine University animal facilities under controlled conditions approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (agreement DDSV54/SPA/07/130) and treated in accordance with national legislation and the European Communities Council Directive on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes 86/609/EEC.

Amphibody space experiment

This experiment was performed in the ISS from March 30 to April 9, 2006, using miniaquariums developed by European Aeronautic Defence and Space (EADS)-Astrium and the German Space Agency. Each miniaquarium measured 80 mm in length by 40 mm in width and 20 mm in height, had two transparent sides that were permeable to O_2 and CO, and contained 32 stage 19-20 embryos. Miniaquariums were inserted in type 1 containers, which had two gas-permeable sides, for protection and handling. Six miniaquariums were mounted on the stationary positions of the Kubik incubator designed for space experiments (Comat Aerospace, Toulouse, France) for microgravity exposure (F_{0g} group), 6 on its 1-*g* centrifuge to perform an inflight 1-*g* control (F_{1g} group), and 12 in an incubator kept on Earth as ground-based controls (G_{1g} group) (**Fig. 1**). An additional miniaquarium was used to determine the developmental stage at launch, which took place 25 h after termination of the integration procedure. Embryos developed during 10 d in the ISS. Living larvae were recovered on landing and separated randomly into 2 groups. The first group was fixed 14 h after landing and the second on d 38. Embryos were provided by 3 couples of parents. Note that we could not purify B cells from larvae because of their limited size.

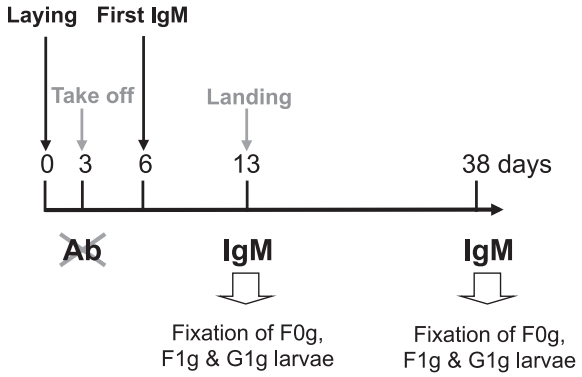


Figure 1. Time line of the Amphibody experiment. F_{0g}, F_{1g}, and G_{1g} indicate embryos that developed in microgravity on the ISS, in the Kubik centrifuge on the ISS to mimic Earth's gravity, and on Earth as ground-based controls, respectively.

Hypergravity

The ESA Botany Experiment (BOTEX) incubator (13) was used to expose embryos at stage 19-20 of development to 3-*g* hypergravity for 10 d. The temperature, time schedule, and handling of embryos were similar to those of the space experiment. Ten miniaquariums containing 32 embryos were placed in the BOTEX centrifuge, and 10 control miniaquariums were kept at 1 *g* in the BOTEX static racks.

Simulation of microgravity

Two miniaquariums containing 32 stage 19-20 embryos were mounted on a desktop random positioning machine (RPM; Dutch Space, Leiden, The Netherlands) located at the Belgian Nuclear Research Centre (SCK · CEN) in a room with an ambient temperature of 20 ± 2°C. The continuous 3-dimensional movement of the samples provided by the RPM randomized the direction of the gravity force, resulting in an average net force approaching 0, therefore simulating microgravity. Random speed, direction, and interval, with an angular velocity of rotation between 55 and 65 deg/s, were applied on the RPM for 10 d. Two other miniaquariums were fixed on the base of the RPM as negative controls.

Irradiation

To simulate the ISS radiation environment, ^{137}Cs γ and ^{252}Cf neutron sources were used as representative of low linear energy transfer (LET) and high LET particles, respectively. ^{137}Cs is a common monoenergetic source of 0.662-MeV γ rays (LET up to 10 keV/μm). The neutron source ^{252}Cf has been characterized within the SCK · CEN calibration room facility (14) and is expelling a neutron spectrum with an average energy of 2.1 MeV (LET up to 250 keV/μm). The source reference values were traceable to primary standards (Physikalisch-Technische Bundesanstalt for γ and National Physical Laboratory for neutrons). Two miniaquariums containing 32 stage 19-20 *P. waltl* embryos each were exposed for 65 h to ionizing radiation in the calibration room facility of SCK · CEN. During irradiation, samples were kept rotating at

2 rpm between the two sources at 20 ± 2°C, being exposed to ~30 μSv/h, totaling 1.950 mSv, energy of 660 keV of γ-rays, and 31.2 μSv/h, totaling 2.028 mSv, and mean energy of 2.1 MeV of neutrons. The total cumulative absorbed dose was measured *in situ* by using thermoluminescent detectors (LiF:Mg, Ti TLD-100; Harshaw/Bicron, Solon, OH, USA; LiF:Mg,Cu,P, MCP-N from TLD-Poland, Kraków, Poland) and optically stimulated luminescence detectors (Al_2O_3:C, TLD-500; Harshaw/Bicron) for γ dosimetry and bubble detectors (BD-PND/BDT; Bubble Technology Industry, Chalk River, ON, Canada) for neutron dosimetry. The total dose received during 65 h corresponds to a stay of 10 d in the ISS. We could not use a 10-d irradiation period for technical and economic reasons. Consequently, we controlled for this higher radiation density to ensure that it had no influence on the results by quantifying DNA-PKc and C3 transcripts in the irradiated larvae. Two nonirradiated control miniaquariums were kept outside the irradiation bunker at the same temperature for the same period of time.

Heat shock

Temperature recorders (SmartButtom data logger; Atal B.V., Purmerend, The Netherlands) placed in type 1 containers revealed a transient temperature increase at the end of the Amphibody experiment. To investigate the effects of this heat shock, we exposed *P. waltl* larvae at stages 36-37 of development (this corresponds to the stages at the end of the Amphibody experiment) to the same temperature variations: 23°C for 24 h, followed by an increase of the temperature up to 27°C over 4 h 40 min, 27°C for 1 h, and finally a slow temperature decrease to 21°C over 14 h (**Fig. 2*A***). Larvae exposed to 30°C for 24 h or maintained at 20°C were used as positive and negative controls, respectively.

Confinement

P. waltl larvae at stages 36-37 of development were placed in 0.5-ml tubes (1 larva/tube) in 400 μl of water at 20°C for 7 h to induce confinement. Note that the volume of water cannot be lower and the duration of this experiment cannot be extended due to oxygen consumption. Larvae placed in miniaquariums at 20°C were used for comparison, and larvae reared under classic conditions in our animal facilities were used as negative controls.

Circadian rhythm

Because the light was switched off during the Amphibody experiment, we investigated the effects of perturbing the circadian rhythm. For that purpose, miniaquariums containing 32 embryos at stages 19-20 were kept in the dark 24 h/d for 10 d at 20°C. Miniaquariums containing 32 embryos at the same stages were placed at 20°C and subjected for the same duration to normal light-dark cycles for comparison.

Real-time quantitative PCR (qPCR)

qPCR primers were designed using GenScript software (**Table 1**). The specificity of each primer pair was tested using a Basic Local Area Search Tool (BLAST) search through the U.S. National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA). RelA-, RelB-, p100-, p105- and GAPDH-specific primers were described previously (10). The cycling protocol was as follows: 3 min at 95°C and then 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at the annealing temperature indicated in Table 1. Standard curves were produced to ensure that amplification efficiencies were similar and in the range of 95-105%. Each qPCR was performed in triplicate and repeated ≥2 times. Data were analyzed using the relative Pfaffl model (15). Relative expressions were calculated by comparison with 4 housekeeping transcripts (α-actin, mtRNA16S, TafII, and GAPDH) using geNorm software and the methodology of Vandesompele et al (16).

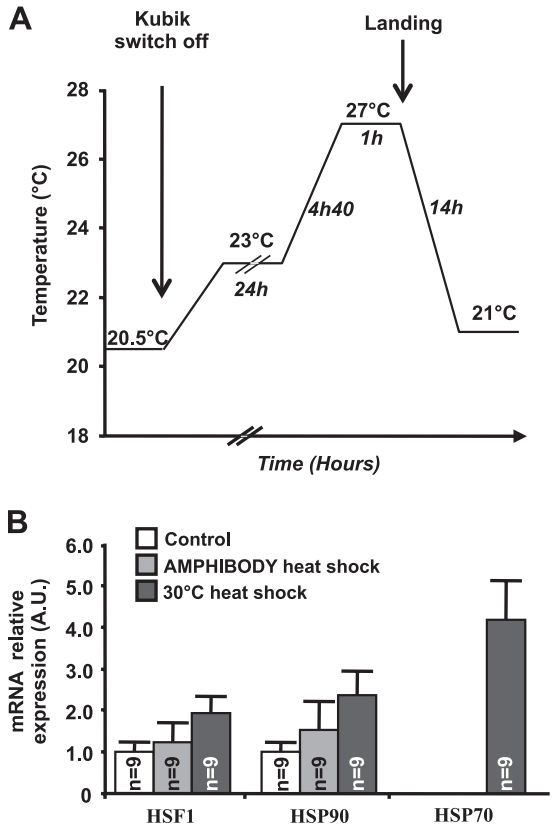


Figure 2. *A*) Schematic representation of temperature variations at the end of the Amphibody experiment. *B*) Quantification of HSF1, HSP90, and HSP70 mRNAs in larvae that were exposed to the heat shock observed at the end of the Amphibody experiment, controls reared at 20°C, and larvae subjected to 30°C (positive controls). Data are means ± SE. Note that HSP70 mRNAs could only be quantified in positive controls.

Statistics

Statistical analyses were performed using SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Outlier values were determined by a boxplot of each group studied. When normality and homogeneity of variances were ascertained, as determined by Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively, ANOVA analyses were performed, and Tukey *post hoc* tests were used to establish intergroup comparisons. When data were not normally distributed, Kruskal-Wallis nonparametric tests were performed, and Dunnett T3 *post hoc* tests were used for intergroup comparisons. When normality and homogeneity of variances were ascertained, Student's *t* test analyses were performed to establish 2-group comparisons. Otherwise, Mann-Whitney tests were used for 2-group comparisons. Values of $P < 0.05$ and < 0.10 were selected to indicate significance and trend, respectively. All results are shown as means ± SE.

TABLE 1. *Primers used in this study*

Primer name	Primer sequence, 5′ to 3′	Annealing temperature (°C)
IgM forward	CAAAGAAACTGGAGATGCGAGTTC	62
IgM reverse	TGATGGGCAGTGGGTAAAAGC	
CD3 forward	AGTGAACATGGCAATCCACA	63
CD3 reverse	GTCATTTGGGATCAGCACCT	
Ikaros forward	GACATGTCCCAGGTTTCAGG	60
Ikaros reverse	GTTGTGCTCCCGAATTTGTT	
HSF1 forward	CATGCAGCTAATGAAAGGCA	60
HSF1 reverse	CAGCAGCAGAAAGTGGTCAA	
HSP70 forward	CATCATCAACGGCTATACTCG	52
HSP70 reverse	GTGGTTCGGTTGCCATGG	
HSP90 forward	GAGGAGGAGGAGGTGGAGA	57
HSP90 reverse	CAGATACGAAAGCCTAACGG	
P38 MAPK forward	GCTGAAGATCCTGGACTTTG	58
P38 MAPK reverse	AGCCCACTGACCAAATATCA	
DNA-PKc forward	TATCGTGCCGATCCAGAC	61
DNA-PKc reverse	GGATACCAGTTTACTTCCATG	
C3 forward	TGGTGACAATGACACTGCCT	62
C3 reverse	CATCCACCCAGATGGAGTCT	
Actin forward	TGGTCGTGACCTGACTGATT	60
Actin reverse	TCACGGACAATCTCACGTTC	
TAFII70 forward	TTCACGAGCTGTCTGTGGAG	60
TAFII70 reverse	CCTGGGAAGCATTTGGTAGA	
mtRNA16S forward	CGTGCAGAAGCGGAGATAA	60
mtRNA16S reverse	TGTCGGGCTGTTGTAGGG	

RESULTS

Survival rates and morphological features at the end of the Amphibody experiment

At 14 h after landing, larvae from the Amphibody experiment were removed from the miniaquariums, and their survival rate, size, and developmental stage were determined (**Fig. 3**). The number of abnormal larvae was low; we determined that there were only 4.8, 0.6, and 4.2% abnormal larvae in the F_{0g}, F_{1g}, and G_{1g} groups, respectively. Good survival rates that did not vary statistically between the different groups were also observed (Fig. 3*A*). Furthermore, all larvae were at the same developmental stage (stages 36-37) and all were of similar size (Fig. 3*B*). Observations were taken again 25 d after the spaceflight. Developmental stages and size were also consistent at this time point. Thus, developmental progress as assessed by developmental stages and sizes at the end of the Amphibody experiment and 25 d later appears to be unaffected.

Quantification of IgM heavy-chain mRNAs

IgM is the only antibody isotype expressed in stages 36-37 (13-d-old) larvae (17). Thus, we quantified IgM heavy-chain transcripts in the larvae of the Amphibody experiment. Our results indicate that, 14 h after landing, the amount of IgM heavy-chain mRNAs doubled (P=0.013) in F_{0g} larvae that had developed on the ISS in comparison with the G_{1g} larvae used as ground-based controls (**Fig. 4**). In an attempt to isolate the effects of gravity, F_{1g} larvae were centrifuged at 1 *g* in the ISS to mimic Earth's gravity. An intermediate transcription level was observed in these larvae. However, because the centrifuge was unexpectedly shut off 30 h before landing, the centrifuged larvae were exposed to several hours of microgravity. This invalidates our inflight 1-*g* control; consequently, it was not analyzed further. Because F_{0g} embryos exposed to microgravity had the same history related to launch, cosmic radiation, and

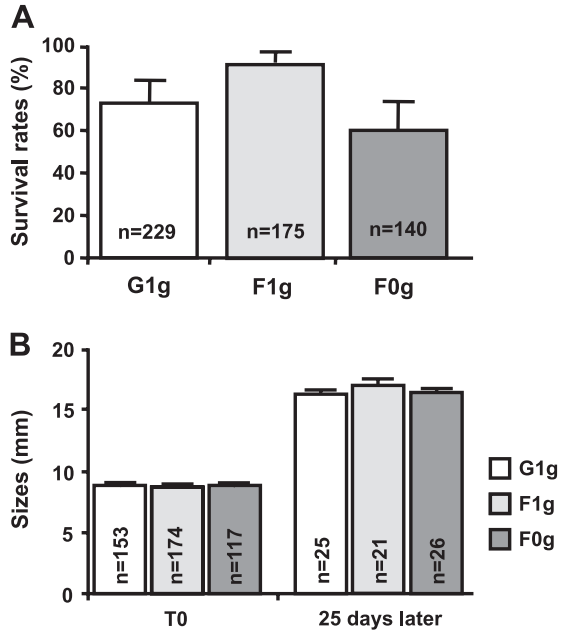


Figure 3. Survival rate (*A*) and size (*B*) of larvae at the end of the Amphibody experiment (means ± SE). Size was also determined 25 d later. F_{0g}, F_{1g}, and G_{1g} indicate embryos that developed in microgravity on the ISS, in the Kubik centrifuge on the ISS to mimic Earth's gravity, and on Earth as ground-based controls, respectively.

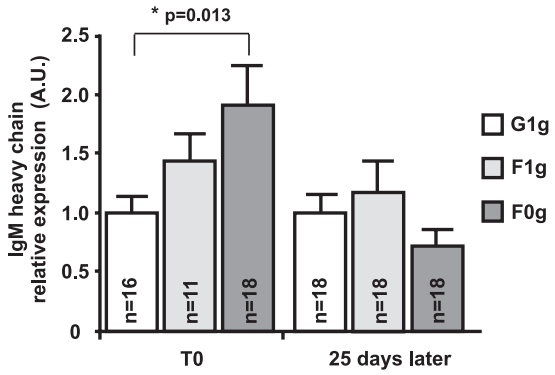


Figure 4. Quantification of IgM heavy-chain mRNAs in larvae that developed in microgravity on the ISS (F_{0g}), in the Kubik centrifuge on the ISS (F_{1g}) and on Earth as ground-based controls (G_{1g}) after landing (T_0) and 25 d later. Data are means ± SE. A.U., arbitrary units. $*P < 0.05$.

heat shock associated with space vehicle reentry into Earth's atmosphere as F_{1g} embryos that were centrifuged, this intermediate transcription level suggests that IgM heavy-chain transcription could be sensitive to gravity changes. At 25 d after landing, the amounts of IgM heavy-chain transcripts were the same in all three groups of larvae. These results indicate that development under spaceflight conditions affects the level of IgM heavy-chain mRNAs and that the immune system recovered after ~3.5 wk.

We tried to confirm these observations by Western blotting using an anti-*Xenopus* IgM monoclonal antibody (hydridoma 10A9). This antibody allowed the detection of *P. waltl* IgM heavy chains in adult spleen but not in 13-d-old larvae. We also generated rabbit polyclonal antibodies using keyhole limpet hemocyanin coupled to two peptides defined in the constant domains of *P. waltl* IgM heavy chains, but this second strategy was not more successful. The failure to detect IgM heavy chains in *P. waltl* larvae is probably due to the paucity of B cells and to the sensitivity of the technique used. Indeed, it was shown (18) that *Xenopus* larvae contain less than 100 IgM^+ cells 5 d after hatching. Because our *P. waltl* larvae hatched 2 d before landing, they probably contain a similarly low number of B cells, thereby explaining these negative Western blot results and restricting our studies at the transcriptional level.

Which factor did affect IgM transcription?

To determine which factor affected the transcription of IgM heavy chains, we recreated the environmental modifications encountered by the embryos during their development in the ISS. Then, we quantified the amounts of IgM heavy-chain transcripts in larvae subjected to each of these perturbations. Our results (**Fig. 5**) indicate that the amount of IgM heavy-chain transcripts is 1.5 times higher ($P=0.027$) in larvae exposed to hypergravity and that there is a strong tendency ($P=0.059$) for a decrease in IgM mRNA expression in larvae subjected to simulated microgravity (10^{-2} to 10^{-3} *g*) in the RPM. The ISS radiation environment, the perturbation of the circadian rhythm, the heat shock associated with the return to Earth, and the confinement did not affect the amount of IgM heavy-chain mRNAs. These results indicate that the change in IgM transcription observed in larvae that developed in the ISS (Fig. 4) is due to the alteration of gravity.

Does this change in IgM transcription indicate a change in lymphopoiesis?

Because lymphopoiesis starts as early as 3 d after laying, as indicated by the first RAG1 expression (19), we wondered whether lymphocyte development could be

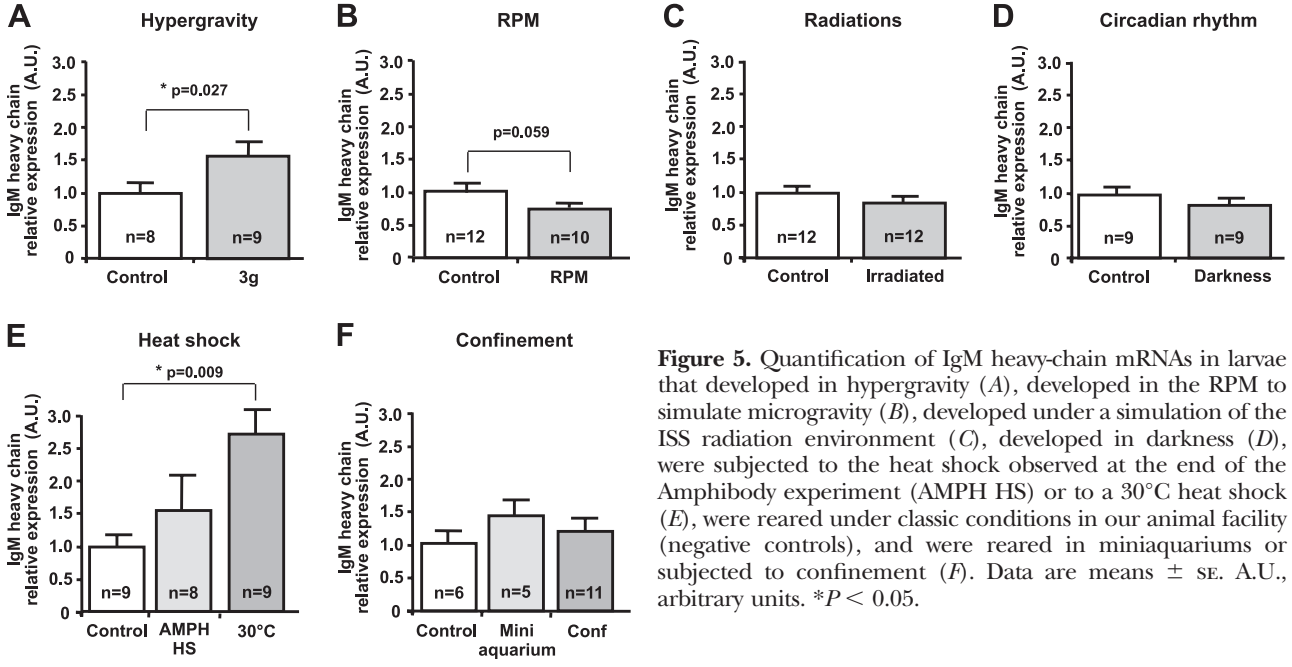


Figure 5. Quantification of IgM heavy-chain mRNAs in larvae that developed in hypergravity (*A*), developed in the RPM to simulate microgravity (*B*), developed under a simulation of the ISS radiation environment (*C*), developed in darkness (*D*), were subjected to the heat shock observed at the end of the Amphibody experiment (AMPH HS) or to a 30°C heat shock (*E*), were reared under classic conditions in our animal facility (negative controls), and were reared in miniaquariums or subjected to confinement (*F*). Data are means ± SE. A.U., arbitrary units. $*P < 0.05$.

affected by gravity changes. To address this question, we quantified Ikaros mRNAs, because Ikaros is expressed in hematopoietic stem cells and lymphoid precursors and is essential for establishing a lymphoid transcriptional program (20, 21). CD3 mRNAs were also quantified as a marker of T-cell differentiation. The amounts of Ikaros mRNAs (**Fig. 6**) were decreased in Amphibody larvae (P=0.032) and in larvae that developed in the RPM (P=0.019) but not in larvae reared at 3 g (P=0.989). Concerning CD3, our results show that its expression tends to be higher (P=0.087) in Amphibody F_{0g} larvae, but no difference was found for this transcript in larvae subjected to hypergravity or microgravity in the RPM. Taken together, these results and data presented in Figs. 4 and 5*A*, *B* suggest that early steps of lymphopoiesis and B-cell development could be more sensitive to gravity changes than T-cell development.

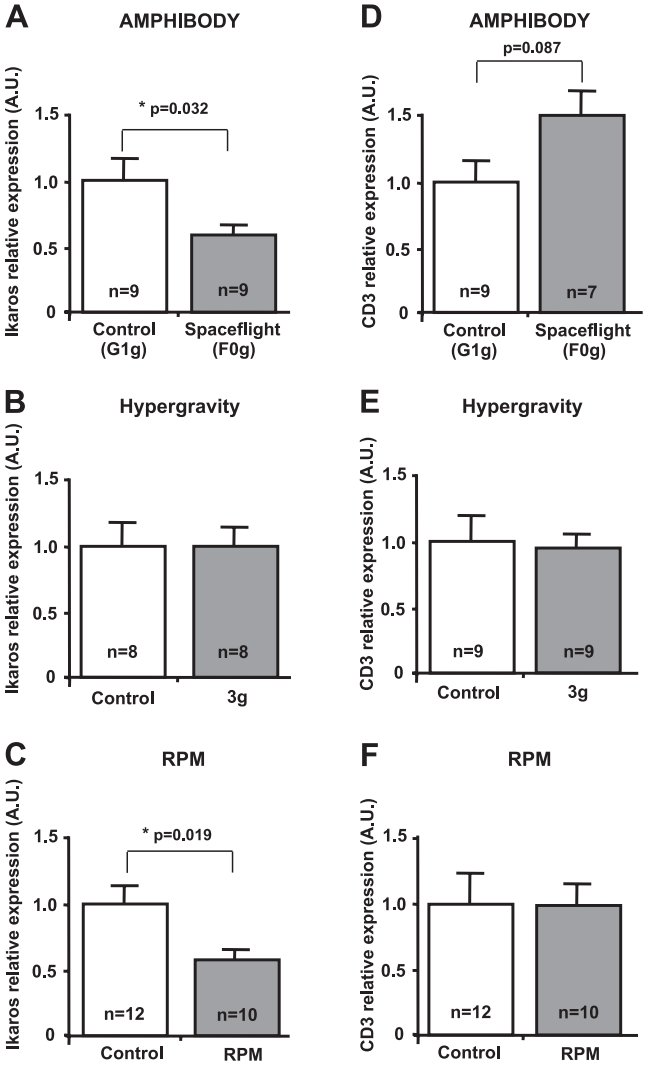


Figure 6. Quantification of Ikaros (*A–C*) and CD3 (*D–F*) mRNAs in larvae from the Amphibody experiment (*A*, *D*) or in larvae that developed at 3 g (*B*, *E*) or in the RPM (*C*, *F*). Data are means ± SE. F_{0g} and G_{1g} indicate embryos that developed in microgravity on the ISS and on Earth as ground-based controls, respectively. A.U., arbitrary units. *$P < 0.05$.

Quantification of other transcripts

To better understand the observed change in IgM transcription, we cloned and sequenced fragments of *P. waltl* heat-shock proteins [HSPs; heat-shock factor (HSF) 1, HSP70, and HSP90], p38 MAPK, DNA-PKc, and complement C3 transcripts. This allowed us to define specific primers to quantify these mRNAs and the those of NF-κB (10) by qPCR in larvae reared in the ISS or subjected to a modification of gravity. We studied the expression of NF-κB mRNAs because this pathway is involved in inflammation, pathogen response, and early amphibian and T- and B-cell development (22, 23). HSPs were studied because of the heat shock that occurred at the end of the Amphibody experiment and the involvement of these molecules in immune system and animal development (24–26). DNA-PKc and p38 MAPK mRNAs were quantified to evaluate the response to space radiation (27, 28). Finally, C3 transcripts were quantified to search for inflammation.

Our results (**Fig. 7**) revealed increases of mRNAs coding for HSF1 in Amphibody larvae (P=0.047), increases of NF-κB transcripts (P=0.027, 0.034, and 0.079) in larvae of the hypergravity experiment, tendencies for a decrease of NF-κB transcripts (P=0.070 and 0.084) in RPM larvae, and an increase of C3 transcripts (P=0.049) in this last group. We tried to quantify HSP70 transcripts, but we found no expression or only a very low level of expression, making quantification impossible in the larvae of the three experiments. These data indicate that the NF-κB signaling pathway is sensitive to a modification of gravity. No modifications in the levels of NF-κB mRNAs were detected in the Amphibody larvae, probably because they were subjected successively to microgravity in the ISS and hypergravity during their travel back to Earth.

DISCUSSION

Effects of gravity changes on *P. waltl* development

Previous experiments revealed a significant effect of microgravity on *P. waltl* early development (29, 30). Abnormalities such as cortical cytoplasmic movements, decreased cell adhesion, and loss of cells were observed (30, 31). Despite these abnormalities, on landing, young larvae had normal morphological phenotypes and swimming behavior. No differences were observed between animals born in space and ground-based controls. These observations show that developmental alterations are transient and indicate the existence of embryological regulation phenomena. In accordance with these studies, we observed low numbers of abnormal larvae at the end of the Amphibody experiment. Size, survival rate, and developmental stage were also similar in all groups of larvae (Fig. 3). Horn and colleagues (13) studied the roll-induced vestibulooocular reflex (rVOR) of Amphibody larvae and noticed that the median rVOR amplitude and gain of the F_{0g}, F_{1g}, and G_{1g} groups were similar at landing. We also

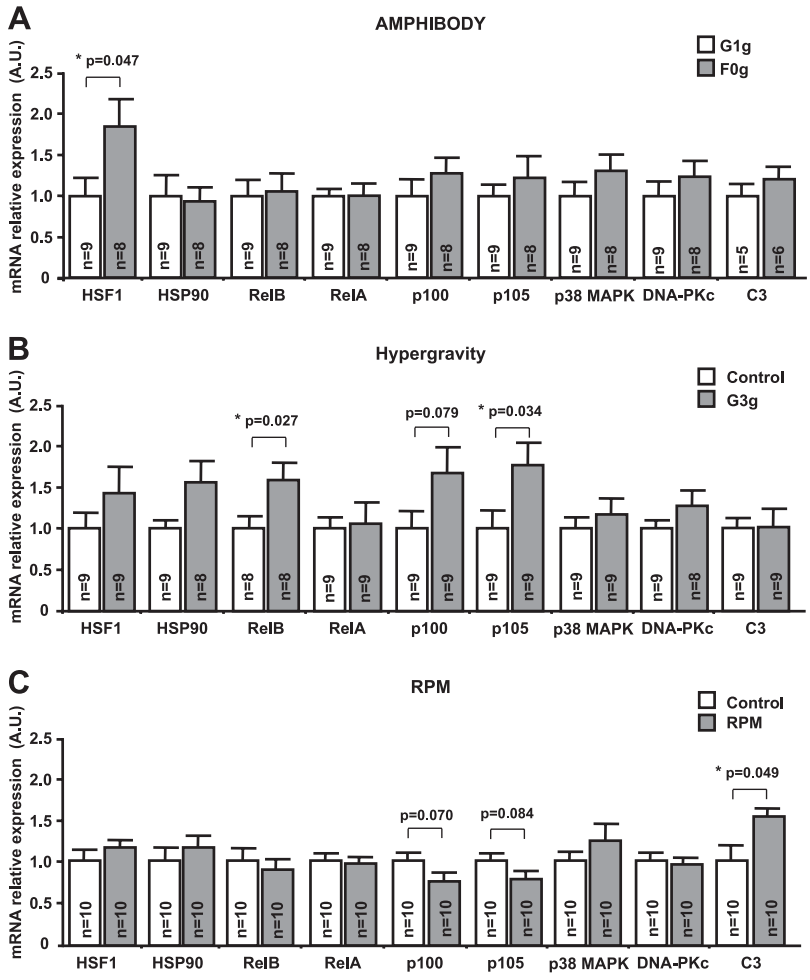


Figure 7. Quantification of HSF1, HSP90, RelB, RelA, p100, p105, p38 MAPK, DNA-PKc, and C3 mRNAs in larvae from the Amphibody experiment (*A*) and in larvae that developed under hypergravity (*B*) or simulated microgravity on the RPM (*C*). Data are means ± SE. Note that the apparent increase of HSP90 mRNA in G_{3g} larvae is not statistically significant according to the Mann-Whitney test used, because data were not normally distributed. A.U., arbitrary units. $*P < 0.05$.

quantified transcript coding for HSPs because these molecules are involved in animal development (25, 26). Indeed, HSP70 and HSP90 have been described as mediators of morphogenesis and developmental stability in various organisms, such as *Drosophila*, zebrafish, and rodents (25, 32, 33). Moreover, several independent studies showed that spaceflight affects the expression of HSPs (34–36). Our experiments revealed an increase of HSF1 mRNA in Amphibody larvae (Fig. 7*A*) but no increase of HSP90 and no expression of HSP70 mRNAs. A hallmark of stressed cells and organisms is the increased synthesis of HSPs. In unstressed cells, HSF1 is a monomer that interacts with HSPs. In response to stress, HSF1 dissociates from the HSP complex, allowing HSF1 to trimerize and bind to heat-shock elements in *HSP* genes to induce, among others, the expression of HSP70 and HSP90 (37). Thus, our data indicate that the heat shock that occurred at the end of the Amphibody experiment or the stresses associated with this space experiment were not sufficiently strong, because the increased level of HSF1 mRNA did not induce an increase of HSP70 and HSP90 mRNAs. Furthermore, gravity changes alone (Fig. 7*B, C*) did not affect the transcription of members of this family. Taken together, these data show the low effecct of gravity modifications on *P. waltl* development at the end of the Amphibody experiment.

IgM heavy-chain transcription is sensitive to gravity changes

During spaceflight, humans and animals are subjected to various environmental modifications that affect the immune system. Here, we show for the first time that IgM heavy-chain transcription is modified when amphibian development occurs under spaceflight conditions. We also demonstrate that this modification is due to the alterations of gravity and not to the other environmental perturbations associated with the space mission (Fig. 5).

It was previously shown that gravity modifications affect the proliferation of primitive hematopoietic progenitors (38, 39) and that spaceflight affects bone marrow subpopulations (40). Consequently, we wondered whether the change in IgM transcription could result from a change in lymphopoiesis. To address this question, we quantified Ikaros and CD3 mRNAs. Results presented in Fig. 6, taken together with results presented in Figs. 4 and 5*A, B*, suggest that early steps of lymphopoiesis and B-cell development are more sensitive to gravity changes than T-cell development. Therefore, we studied the expression of NF-κB members, because of their crucial role in inflammation, response to pathogens, and early amphibian and T- and B-cell development (22, 23). Moreover, Boonyaratanakornkit *et al.* (41) observed a modification of NF-κB

mRNA expression when human T cells were cultured in an RPM. Our data (Fig. 7) revealed an up-regulation of NF-κB transcripts when larvae developed in hypergravity and a down-regulation of these mRNAs when larvae developed in the RPM, thereby confirming the sensitivity of this signaling pathway to gravity changes. These changes in NF-κB transcription are not likely to be due to an infection during the experiments, because embryos and larvae were distributed in different miniaquariums, and the transparent sides of miniaquariums were impermeable to microorganisms. Furthermore, the quantification of C3 mRNAs did not reveal an inflammation. An increase in this transcript was detected in larvae that developed in the RPM (Fig. 7*C*) because of the mechanical stresses generated by this machine that continuously changes the orientation of miniaquariums to mimic microgravity. Our data also indicate that animal development, as assessed by the number of abnormal larvae, their size, developmental stage, rVOR, and the expression of 3 HSP transcripts, was not affected at the end of the Amphibody experiment. We therefore believe, given the fact that NF-κB and IgM mRNA levels vary in the same way in micro- and hypergravity, that these changes in NF-κB transcription, coupled with the changes in Ikaros transcription, reflect a change in lymphopoiesis. The fact that T-cell development, which also requires NF-κB, seems unaffected may be due to a differential effect of gravity changes on T-cell-specific factors. Unfortunately, it is currently impossible to test this hypothesis, because these factors have not yet been characterized in *P. waltl*. And, finally, because the NF-κB pathway is used by a wide range of cells, it is possible that other cell types are affected by gravity changes.

Effects of the other environmental perturbations encountered during the space mission

The lack of effect of confinement on IgM mRNA levels is not surprising, because the density of embryos or larvae per milliliter of water in miniaquariums was similar to the density used in our animal facility to rear them under classic conditions. Moreover, a previous study demonstrated that after 110 or 240 d of confinement, the numbers of B and T cells in human peripheral blood were unaffected (42).

Significant decreases in IgG1, IgG2a, and IgG2b were reported in mice exposed to chronic low-dose γ irradiation (43), but we did not detect a change in IgM transcription in embryos exposed to the ISS radiation environment (Fig. 5*C*). The lack of effect of space radiation was confirmed by the quantification of DNA-PKc and p38 MAPK mRNAs (Fig. 7*A*). The team of Dr. S. Baatout (SCK · CEN) exposed mouse fetal fibroblasts to the same simulation of ISS radiation and also did not detect significant gene expression alterations using microarrays. These data, combined with ours, indicate that such low doses of radiation have a limited effect on gene expression.

Two studies reported that increasing water temperature by 10°C increases IgM levels in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (44) and the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* (45). Figure 5*E* shows that the same occurs when *P. waltl* larvae are placed at 30°C, which is 10°C above normal rearing temperature. No change in IgM transcription was observed in larvae exposed to the heat shock encountered at the end of the Amphibody experiment, because this heat shock was not sufficiently important; the temperature increased by only 2.5°C during 24 h and then by 6.5°C during 1 h (Fig. 2*A*). This conclusion is confirmed by the fact that we did not detect increased levels of HSP transcripts when larvae were subjected to the Amphibody heat shock recreated in the laboratory (Fig. 2*B*).

Another important factor encountered during spaceflight is the disruption of the circadian rhythm. Melatonin was shown to influence antibody production in mammals. Indeed, inhibition of melatonin synthesis by a disturbance of the circadian rhythm modified antibody production in immunized BALB/c mice, whereas it had no effect on basal IgM production in unimmunized animals (46). This last observation was also made in this study (Fig. 5*D*), which involved unimmunized *P. waltl* larvae.

In summary, this study shows that the amounts of IgM heavy-chain and NF-κB transcripts are affected in the same way by gravity changes during animal development, thereby suggesting a modification of lymphopoiesis. Because antibody synthesis and NF-κB signaling are conserved in jawed vertebrates, we believe that these changes could also occur in mammals. Further experiments using other animal models allowing B-cell purification and in which B-cell development is better characterized will be required to evaluate the consequences of these changes on health. Indeed, many diseases, including cancer, atherosclerosis, diabetes, and lymphoid malignancies, are associated with dysregulation of NF-κB (22). FJ

The authors thank D. Chaput (CNES) for his support during the space mission, J. Robert (University of Rochester, Rochester, NY, USA), for providing the 10A9 hydridoma, M. Beck and F. Mastroleo (SCK · CEN) for their support during the irradiations and RPM experiments, the European Space Agency (ESA) for the spaceflight opportunity, the CNES, the French Ministry of Higher Education and Research, the Lorraine area, Lorraine University, and the ESA/Belspo/PRODEX program for their financial support. C.H.-S. and N.G. were supported by postdoctoral and Ph.D. fellowships from the Fonds National de la Recherche of Luxembourg, V.S. by a CNES postdoctoral fellowship, and M.B. by a Ph.D. fellowship of the French Ministry of Higher Education and Research.

REFERENCES

1. Guéguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J.-L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C., and Frippiat, J.-P. (2009) Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J. Leukoc. Biol.* **86,** 1027–1038
2. Kimzey, S. L. (1977) Hematology and immunology studies. In *Biomedical Results from Skylab* (Johnson, R. S., and Dietlein, L. F., eds) pp. 248–282, National Aeronautics and Space Administration, Washington, DC
3. Committee on the Planetary Science Decadal Survey (2011) *Vision and Voyages for Planetary Science in the Decade 2013–2022*, National Academy of Sciences, Washington, DC

4. Stowe, R. P., Sams, C. F., Mehta, S. K., Kaur, I., Jones, M. L., Feeback, D. L., and Pierson, D. L. (1999) Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* **65,** 179–186
5. Rykova, M. P., Antropova, E. N., Larina, I. M., and Morukov, B. V. (2008) Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. *Acta Astraunaut.* **63,** 697–705
6. Voss, E. W., Jr. (1984) Prolonged weightlessness and humoral immunity. *Science* **225,** 214–215
7. Konstantinova, I. V., Rykova, M. P., Lesnyak, A. T., and Antropova, E. A. (1993) Immune changes during long-duration missions. *J. Leukoc. Biol.* **54,** 189–201
8. Boxio, R., Dournon, C., and Frippiat, J.-P. (2005) Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Appl. Physiol.* **98,** 905–910
9. Bascove, M., Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Tschirhart, E., and Frippiat, J.-P. (2009) Spaceflight-associated changes in immunoglobulin *VH* gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J.* **23,** 1607–1615
10. Bascove, M., Guéguinou, N., Schaerlinger, B., Gauquelin-Koch, G., and Frippiat, J.-P. (2011) Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J.* **25,** 2947–2955
11. Cooper, A. D., and Alder, M. N. (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124,** 815–822
12. Gallien, L., and Durocher, M. (1957) Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **91,** 97–114
13. Gabriel, M., Frippiat, J.-P., Frey, H., and Horn, E. R. (2012) The sensitivity of an immature vestibular system to altered gravity. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* **317,** 333–346
14. Vanhavere, F., and Coeck, M. (2001) Comparison between thermoluminescence and electronic dosimetry results at the Belgian Nuclear Research Centre. *Radiat. Prot. Dosimetry* **96,** 105–108
15. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29,** e45
16. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3,** research0034.1–11
17. Schaerlinger, B., Bascove, M., and Frippiat, J.-P. (2008) A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. *Mol. Immunol.* **45,** 776–786
18. Mussmann, R., Courtet, M., and Du Pasquier, L. (1998) Development of the early B cell population in *Xenopus*. *Eur. J. Immunol.* **28,** 2947–2959
19. Frippiat, C., Kremarik, P., Ropars, A., Dournon, C., and Frippiat, J.-P. (2001) The recombination-activating gene 1 of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) is transcribed in lymphoid tissues and in the central nervous system. *Immunogenetics* **52,** 264–275
20. Georpopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994) The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* **79,** 143–156
21. Boudarra, N., Frippiat, C., Dournon, C., and Frippiat, J.-P. (2002) An alternative internal splicing site defines new Ikaros isoforms in *Pleurodeles waltl*. *Dev. Comp. Immunol.* **26,** 659–673
22. Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009) Regulation and function of NF-κB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **27,** 693–733
23. Zhang, C., Carl, T. F., Trudeau, E. D., Simmet, T., and Klymkowsky, M. W. (2006) An NF-κB and slug regulatory loop active in early vertebrate mesoderm. *PLoS One* **1,** e106
24. Tsan, M. F., and Gao, B. (2009) Heat shock proteins and immune system. *J. Leukoc. Biol.* **85,** 905–910
25. Rutherford, S. L., and Lindquist, S. (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396,** 336–342
26. Patterson, S. J., and Klingenberg, C. P. (2007) Developmental buffering: how many genes? *Evol. Dev.* **9,** 525–526
27. Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P. B., Hagan, M. P., and Grant, S. (2003) MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* **22,** 5885–5896
28. Amundson, S. A., Do, K. T., Shahab, S., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., and Fornace, A. J., Jr. (2000) Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* **154,** 342–346
29. Aimar, C., Bautz, A., Durand, D., Membre, H., Chardard, D., Gualandris-Parisot, L., Husson, D., and Dournon, C. (2000) Microgravity and hypergravity effects on fertilization of the salamander *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian). *Biol. Reprod.* **63,** 551–558
30. Gualandris-Parisot, L., Husson, D., Bautz, A., Durand, D., Kan, P., Aimar, C., Membre, H., Duprat, A.-M., and Dournon, C. (2002) Effects of space environment on embryonic growth up to hatching of salamander eggs fertilized and developed during orbital flights. *Biol. Sci. Space* **16,** 3–11
31. Dournon, C. (2003) Developmental biology of urodele amphibians in microgravity conditions. *Adv. Space Biol. Med.* **9,** 101–131
32. Rupik, W., Jasik, K., Bembenek, J., and Widłak, W. (2011) The expression patterns of heat shock genes and proteins and their role during vertebrate's development. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **159,** 349–366
33. Yeyati, P. L., Bancewicz, R. M., Maule, J., and van Heyningen, V. (2007) Hsp90 selectively modulates phenotype in vertebrate development. *PLoS Genet.* **3,** e43
34. Kumei, Y., Morita, S., Nakamura, H., Shinomiya, K., Ohya, K., and Shimokawa, H. (2002) Does microgravity induce apoptotic signal in rat osteoblasts via cjun-n-terminal kinase? *J. Gravit. Physiol.* **9,** P263–P264
35. Ishihara, A., Fujino, H., Nagatomo, F., Takeda, I., and Ohira, Y. (2008) Gene expression levels of heat shock proteins in the soleus and plantaris muscles of rats after hindlimb suspension or spaceflight. *J. Physiol. Sci.* **58,** 413–417
36. Shimada, N., and Moorman, S. J. (2006) Changes in gravitational force cause changes in gene expression in the lens of developing zebrafish. *Dev. Dyn.* **235,** 2686–2694
37. Akerfelt, M., Morimoto, R. I., and Sistonen, L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11,** 545–555
38. Davis, T. A., Wiesmann, W., Kidwell, W., Cannon, T., Kerns, L., Serke, C., Delaplaine, T., Pranger, A., and Lee, K. P. (1996) Effect of spaceflight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myelopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **60,** 69–76
39. Plett, A. P., Abnour, R., Frankovitz, S. M., and Orschell, C. M. (2004) Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* **32,** 773–781
40. Ortega, M. T., Pecaut, M. J., Gridley, D. S., Stodieck, L. S., Ferguson, V., and Chapes, S. K. (2009) Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **106,** 548–555
41. Boonyaratanakornkit, J. B., Cogoli, A., Li, C. F., Schopper, T., Pippia, P., Galleri, G., Meloni, M. A., and Hughes-Fulford, M. (2005) Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J.* **19,** 2020–2022
42. Choukèr, A., Smith, L., Christ, F., Larina, I., Nichiporuk, I., Baranov, V., Bobrovnik, E., Pastushkova, L., Messmer, K., Peter, K., and Thiel, M. (2002) Effects of confinement (110 and 240 days) on neuroendocrine stress response and changes of immune cells in men. *J. Appl. Physiol.* **92,** 1619–1627
43. Courtade, M., Caratero, A., Jozan, S., Pipy, B., and Caratero, C. (2001) Influence of continuous, very low-dose gamma-irradiation on the mouse immune system. *Int. J. Radiat. Biol.* **77,** 587–592
44. Dominguez, M., Takemura, A., Tsuchiya, M., and Nakamura, S. (2004) Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* **241,** 491–500
45. Cui, M., Zhang, Q., Yao, Z., Zhang, Z., Zhang, H., and Wang, Y. (2010) Immunoglobulin M gene expression analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides,* following heat shock and *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* **29,** 1060–1065
46. Cernysiov, V., Gerasimcik, N., Mauricas, M., and Girkontaite, I. (2010) Regulation of T-cell-independent and T-cell-dependent antibody production by circadian rhythm and melatonin. *Int. Immunol.* **22,** 25–34

Received for publication July 23, 2012.
Accepted for publication September 4, 2012.

Identification du transcrit de la DNA polymérase mu (Polμ) chez *P. waltl* et modulation de son expression suite à des stress rencontrés lors de vols spatiaux

1. Introduction

La recombinaison V(D)J permet le rapprochement des segments VH-D, D-JH et VL-JL pour créer des gènes fonctionnels d'anticorps. Afin d'augmenter la diversité du répertoire d'anticorps, des nucléotides (N) sont ajoutés au niveau des jonctions VH-D, D-JH pour la chaîne lourde et VL-JL pour la chaîne légère, formant des « régions N ». Ce sont les polymérases de la famille polX qui sont responsables de la formation de ces régions N. Cette famille comprend les DNA polymérases beta (β), lambda (λ) et mu (μ) ainsi que la Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT). Ces enzymes ont des structures proches et sont spécialisées dans la réparation des cassures double brin (Moon *et al.*, 2007).

La Polμ de l'homme et de la souris ont été décrites pour la première fois par les équipes de J.C. Weill (Aoufouchi *et al.*, 2000) et de L. Blanco (Domínguez *et al.*, 2000 ; García-Díaz *et al.*, 2000). Ces équipes ont observé que la Polμ possède une structure plus proche de la TdT que les autres membres de la famille PolX. Ces deux protéines ont des structures très similaires et des jonctions exoniques très conservées. Le manque de similarité avec les jonctions exoniques des polymérases β et λ montre que la divergence de la Polμ et de la TdT est plus récente que celle de la Polβ et de la Polλ.

En 2003, Bertocci *et al.* ont observé, chez des souris déficientes pour la Polμ, une altération du réarrangement des gènes des chaînes légères kappa, ainsi qu'une réduction de la longueur du CDR3 de ces chaînes. Ces observations montrent donc le rôle de la Polμ dans le réarrangement des segments géniques des chaînes légères, au contraire de la TdT qui est principalement impliquée dans les réarrangments de la chaîne lourde (Gilfillan *et al.*, 1993 ; Komori *et al.*, 1993). Cette différence est renforcée par le fait que la Polμ a un profil d'expression différent de celui de la TdT. En effet, l'expression de cette dernière est limitée aux organes hématopoïétiques alors que la Polμ est exprimée dans différents organes, notamment les organes génitaux dans lesquels l'ADN subi des cassures double-brin lors des échanges chromosomiques pendant la première division de méïose (Aoufouchi *et al.*, 2000).

Ici, notre travail a consisté tout d'abord à caractériser le transcrit codant la Polμ de *P. waltl* puis à étudier son expression au cours du développement précoce ainsi que dans

différents organes de l'animal adulte. Ensuite, nous avons étudié l'impact d'un vol spatial ou de stress associés à un vol spatial sur l'expression de ce transcrit chez cet animal.

2. Résultats

2.1. Identification de deux transcrits codant la Polμ chez *P. waltl*

Nous avons tout d'abord réalisé un alignement des séquences nucléotidiques des transcrits Polμ de différentes espèces afin d'identifier les régions les plus conservées au sein de ces molécules. Nous avons ensuite défini des amorces (Polμ For et Polμ Rev) dans ces régions (**tableau 2**) afin de pouvoir isoler par PCR un fragment de l'ADNc correspondant chez *P. waltl*. Ces amorces nous ont permi d'amplifier à partir d'ADNc de larve au stade 32b (selon la table de développement du pleurodèle de Gallien et Durocher) deux produits de PCR : l'un à 814 pb (« short ») et l'autre à 917 pb (« long »). Ces 2 produits ont ensuite été séquencés. Ils présentaient tous deux une homologie d'environ 60% avec les transcrits de la Polμ de nombreuses espèces (homme, souris, xénope et poisson-zèbre notamment). Des oligonucléotides ont ensuite été définis (Polμ GSP1, Polμ NGSP1, Polμ GSP2 et Polμ NGSP2) afin d'effectuer des PCR-RACE 5' et 3' pour obtenir les séquences entières des transcrits de la Polμ chez cet animal (**tableau 2**). La PCR-RACE effectuée en 3' a permi d'obtenir un fragment de 953 pb. Au sein de cette séquence, nous avons pu identifier un site unique de polyadénylation dans le 3'UTR (**fig. 21**). En ce qui concerne la PCR-RACE effectuée en 5', un produit d'environ 700 pb a été obtenu. Cette séquence possède un seul codon « start » (**fig. 21**).

2.2. Organisation de l'ARNm Polμ de *P. waltl*

Nous avons determiné les bordures exoniques des transcrits de la Polμ chez plusieurs espèces en alignant les séquences d'ADNc avec leur séquence génomique correspondantes. Pour toutes les espèces (homme, souris, xénope, poisson-zèbre), l'ADNc est composé de 11 exons. Les bordures exoniques sont très conservées entre espèces, ce qui nous a permi d'identifer également 11 exons pour la séquence « long » et 10 pour la séquence « short » chez *P. waltl* (**fig. 20B**). La séquence « short » ne possède pas l'exon 8 et est donc issue d'un épissage alternatif de l'ARNm.

2.3. Position phylogénétique de Polμ de *P. waltl*

Afin de confirmer que nous avons bien isolé l'ADNc de la Polμ chez le pleurodèle, nous avons construit un arbre phylogénétique avec la séquence « long » et les séquences

connues dans les bases de données des polymérases de la famille PolX. La position de la séquence obtenue chez *P. waltl* confirme que nous avons isolé et séquencé l'ADNc de la Polμ chez cet animal (**fig. 22**).

2.4. Profil d'expression de l'ARNm de Polμ durant le développement précoce de *P. waltl*

Afin d'étudier le profil d'expression de l'ARNm de la Polμ au cours du développement précoce du pleurodèle, nous avons défini des oligonucléotides permettant de réaliser des PCR quantitatives en temps réel (**tableau 2**) de sorte que les 2 isoformes soient quantifiées simultanément à partir d'ADNc de larves de pleurodèle du stade 2 au stade 33a. Le profil d'expression (**fig. 23 A et B**) montre une forte expression au début du développement (des stades 2 à 12, correspondant à la segmentation et la gastrulation), diminuant ensuite des stades 14 à 26 (au cours de la neurulation) avant de réaugmenter à partir du stade 30 (bourgeon caudal), coïncidant avec l'expression des transcrits des premières chaînes lourdes d'IgM (stade 29, Frippiat *et al.*, 2001).

2.5. Expression de l'ARNm de Polμ dans les organes de *P. waltl* adulte

Nous avons quantifié dans différents organes de *P. waltl* les transcrits codant la Polμ à l'aide des mêmes amorces de PCR quantitative qu'au point 2.4 ci-dessus. Le signal obtenu avec le thymus a été utilisé comme référence (fixé arbitrairement à 1). Une plus faible quantité de transcrits Polμ a été observée dans le cerveau, les reins, le foie, l'intestin et les poumons. Presque aucun transcrit n'a été detecté par cette méthode dans le sang périphérique et le cœur (données non montrées). En revanche, de nombreux transcrits ont été détectés dans les testicules et la rate (**fig. 24**).

2.6. Expression du transcrit Polμ dans les larves de *P. waltl* soumises à différents stress

L'expression du transcrit de la Polμ a été quantifiée par RT-PCR quantitative en temps réel de manière relative par rapport à l'expression des transcrits de 4 gènes de ménage (α-actine, GAPDH, TafII et ARN16S mitochondrial). Pour chaque expérience, l'expression relative moyenne du transcrit de la Polμ du groupe contrôle a été arbitrairement fixée à 1 comme valeur de référence. La **figure 25** montre qu'il y a une tendence à la baisse de la transcription de Polμ chez les larves qui se sont développées à bord de l'ISS (**fig. 25A,** p=0,089 ; test t) et une dimintion significative de l'expression de ce transcrit (p=0,006 ; test t) chez les larves soumises aux radiations spatiales (**fig. 25D**). En revanche, l'exposition des larves à l'hypergravité (3G) ou à la microgravité (10^{-2}G) simulée n'influence pas la

transcription de ce gène (respectivement p=0,326 ; test t, **fig. 25B** et p=0,989 ; test t, **fig. 25C**). D'autre part, un stress biomécanique (larves soumises à des vibrations de 15 Hertz durant 5 heures) tend à induire une légère augmentation de la transcription de ce gène (p=0,102 ; test t, **fig. 25E**).

3. Discussion

3.1. Conservation et structure de la Polμ chez *P. waltl*

Aucune étude n'a encore porté sur la DNA polymérase mu du pleurodèle. Chez cette espèce, la protéine est codée par un transcrit de 11 exons comme chez les autres vertébrés. Nous avons détecté une isoforme courte (10 exons) qui ne posséde pas l'exon n°8 (Polμ Δ Ex8, **fig. 20A et B**). L'isoforme courte ("short") ne représente qu'une faible proportion (6 à 16%) de l'isoforme longue ("long") dans la rate ou les testicules du pleurodèle. Chez les mammifères, il existe de nombreuses isoformes de la Polμ qui représentent la majorité des ARNm de cette protéine (90% environ). La plupart génèrent des protéines non fonctionnelles puisqu'elles ne possèdent pas les exons codant le site actif de l'enzyme (Aoufouchi *et al.*, 2000 ; Reynaud *et al.*, 2001). Ces isoformes seraient un moyen de réguler l'activité de la protéine (Lucas *et al.*, 2005). Dans notre cas, l'exon 8 code pour une partie du site actif de l'enzyme (**fig. 20B**), suggérant la même fonction pour cette isoforme. Cependant, la proportion de celle-ci par rapport à l'isoforme « long » suggère un mécanisme de régulation différent de celui des mammifères. Cela corrobore la suggestion de Bascove & Frippiat (2010) concernant la régulation de la transcription d'AID qui est différente chez *P. waltl* par rapport à ce qui a été décrit chez les mammifères. Le nombre moins important d'isoformes chez cet espèce n'est pas du à un défaut de la machinerie responsable de l'épissage puisque, par exemple, il existe de nombreuses isoformes de la protéine Ikaros chez *P. waltl* (Boudarra *et al.*, 2002).

La traduction *in silico* de l'isoforme longue aboutit à une protéine de 498 acides aminés (**fig. 21**). Les 2 régions responsables de la fonction de la Polμ sont présentes chez *P. waltl*, le domaine BRCT servant à interagir avec les protéines de la machinerie de recombinaison V(D)J (Ku XRCC4-Ligase IV, Nick McElhinny *et al.*, 2005) et le domaine PolX, très conservé au cours de l'evolution, qui correspond au site actif de l'enzyme (domaine de laison à l'ADN, de fixation des NTP et de liaison des cofacteurs enzymatiques (ions métaliques, **fig. 20B**)). La conservation de cette protéine chez *P. waltl* est confirmée par l'arbre phylogénétique que nous avons construit (**fig. 22**).

3.2. Expression des transcrits Polμ au cours du développement précoce de *P. waltl*

Par PCR temps réel, nous avons détecté de grandes quantités de transcrits Polμ dans les premiers stades de développement de *P. waltl* (**fig. 23A et B**). Cette expression est environ 4 fois plus faible pendant la neurulation et augmente à nouveau lorsque les ARNm de chaînes lourdes d'IgM apparaissent. Ces résultats indiquent que la Polμ a un rôle au cours du développement embryonnaire précoce, différent de celui associé à la recombinaison V(D)J qui ne commence qu'au stade 26 (Frippiat *et al.*, 2001). Au début de l'ontogenèse, les cellules somatiques prolifèrent très activement et sont sensibles aux stress génotoxiques. Par conséquent, des mécanismes robustes sont nécessaires pour préserver la stabilité de leur génome (Heyer *et al.*, 2000). La DNA Polymérase μ, qui fait partie de la réponse cellulaire aux cassures double brin d'ADN (Capp *et al.*, 2007), est bien équipée pour assurer la réparation des cassures double-brin au niveau de l'ADN embryonnaire et ainsi éviter des dégâts génomiques, ce qui explique son expression précoce.

Le fait d'observer une augmentation de l'expression de la Polμ lors du processus de recombinaison V(D)J est logique puisqu'elle y est directement impliquée (ajout de nucléotides aux jonctions VL-JL).

3.3. Expression des transcrits codant la Polμ dans des organes de *P. waltl* adulte

Comme décrit dans d'autres études chez l'homme, la Polμ est exprimée dans une grande variété de tissus (Aoufouchi *et al.*, 2000). Dans notre étude, la Polμ est exprimée dans différents tissus, dont les tissus lymphoïdes (thymus, rate, **fig. 24**). Frippiat *et al.* (2001) ont pu observer que les transcrits codant Rag1 sont plus nombreux dans le thymus de larves que dans la rate de pleurodèle adulte, suggérant ainsi une expression décroissante de Rag1 avec l'âge. Gozalbo-López *et al.* (2009) ayant décrit le rôle de la Polμ dans la réparation des cassures double-brin d'ADN générées par Rag, nous pouvons supposer que l'expression de Polμ est liée à celle de Rag1.

De plus, la Polμ pourrait jouer un rôle dans le processus des hypermutations somatiques affectant les gènes des immunoglobulines (Domínguez *et al.*, 2000 ; Ruiz *et al.*, 2001 ; 2004). Or, si la Polμ est impliquée dans la machinerie des hypermutations somatiques des immunoglobulines, la baisse de son expression avec l'âge de l'individu suggère que ces hypermutations diminuent aussi avec l'âge.

Nous avons également détecté un taux élevé de transcrit codant la Polμ dans les testicules du pleurodèle (**fig. 24**). Dans les organes génitaux, il existe une forte expression des polymérases de réparation d'ADN (beta, eta, zeta, iota, kappa and lambda). Une expression

de la Polμ similaire à celle de notre étude a également été observée dans les organes génitaux du poisson-zèbre (Beetz *et al.*, 2007). Cette forte expression dans cet organe peut donc être rapprochée à celle observée au début du développement de *P. waltl* (**fig. 23**). En effet, comme suggéré ci-dessus, cette enzyme pourrait protéger le génome des cellules germinales contre les cassures double-brin d'ADN afin de préserver l'intégrité du génome et d'éviter la transmission de mutations. Cette hypothèse est renforcée par le rôle de la Polλ, autre membre de la famille PolX, dans la réparation de l'ADN lors de la méïose puisque cette enzyme a été détectée dans des spermatocytes au stade pachytène de la première division de méïose (García-Díaz *et al.*, 2000).

3.4. Quantification des transcrits Polμ chez des larves de *P. waltl* ayant subi des stress associés aux vols spatiaux

La transcription du gène codant la Polμ est diminuée d'environ 40% chez des larves de *P. waltl* qui se sont developpées à bord de l'ISS (**fig. 25A**). En revanche, aucune différence significative dans la transcription de ce gène n'est observable suite à une exposition à l'hypergravité (3G, **fig. 25B**) ou encore à la microgravité simulée (10^{-2}G, **fig. 25C**). Cela signifie qu'une modification de la gravité n'influence pas l'expression du transcrit de la Polμ. Une légère augmentation du taux de ce transcrit est observée suite à une exposition de 5 heures à des vibrations de 15 Hertz (**fig. 25E**). Cette augmentation n'est pas significative car la durée d'exposition et/ou l'intensité des vibrations n'est pas assez importante, mais cela suggère que les stress biomécaniques peuvent influencer positivement la transcription de ce gène. En revanche, suite aux radiations spatiales, la transcription du gène de la Polμ est sérieusement diminuée (d'environ 40% comme chez les larves qui se sont développées dans l'ISS, **fig. 25D**) ce qui laisse à penser que ce sont les radiations subies lors du vol spatial qui seraient responsables de la diminution de la transcription observée.

4. Conclusion

Ce travail représente la première étude concernant la DNA polymérase mu chez un amphibien urodèle. Nous avons constaté que chez le pleurodèle, il existe 2 isoformes de la Polμ, l'isoforme majoritaire étant la forme entière qui code la protéine foncionnelle, ce qui diffère des autres espèces. Son expression est forte au début du développement, lui permettant de protéger le génome et d'assurer le bon développement précoce de l'animal. Cette expression diminue après la gastrulation et réaugmente lors de la synthèse des immunoglobulines. Chez l'adulte, son expression est forte dans les tissus hématopoïétiques

primaires et secondaires ainsi que dans les organes génitaux. Cela permet respectivement d'assurer le bon déroulement de la recombinaison V(D)J dans les organes lymphoïdes primaires, de jouer un rôle dans les hypermutations somatiques des gènes d'anticorps dans les organes lymphoïdes secondaires et enfin de protéger l'ADN des cellules germinales des mutations pour éviter de les transmettre à la génération suivante. Des modifications de la gravité n'influencent pas la transcription du gène codant la DNA polymérase mu. En revanche, les radiations spatiales diminuent fortement le taux de transcription de la DNA Polymérase mu comme lorsque des cellules de la lignée RAMOS (provenant du lymphome de Burkitt humain) sont exposées à des UV ou à des rayons γ (Aoufouchi *et al.*, 2000).

Figures et tableau concerant l'étude de la Polμ

Nom	Séquence (5' → 3')	Utilisation	Température d'hybridation (°C)
Polμ-For	CCAGTATATGCCTGCCAGAGA	PCR	63
Polμ-Rev	TGCTTTGATCCAGTCCACCC	PCR	63
Polμ-GSP1	ACTGTTGCCGAACTCTGCCTCCTCT	5'-RACE-PCR	63
Polμ-NGSP1	GCCAGTATCTCCAAAGCATCCGTGA	5'-RACE-PCR	63
Polμ-GSP2	AGAGCTCCAGCACAGCAGCAGAAAA	3'-RACE-PCR	64
Polμ-NGSP2	CATTTGCTCTGCTTGGGTGGACTG	3'-RACE-PCR	64
Polμ-long-For	TGGAAGCTGACAAGATCCAG	PCR en temps réel	59
Polμ-long- Rev	CTGCTTCCCTCTTTGAAACC	PCR en temps réel	59
GAPDH-For	GAAGGTAGTAAGCAACGCCTCCT	PCR en temps réel	65
GAPDH-Rev	CACAGCATGTACAGTGGTCATCA	PCR en temps réel	65
Actine-Q-For	TGGTCGTGACCTGACTGATT	PCR en temps réel	60
Actine-Q-Rev	TCACGGACAATCTCACGTTC	PCR en temps réel	60
TafII-Q-For	TTCACGAGCTGTCTGTGGAG	PCR en temps réel	60
TafII-Q-Rev	CCTGGGAAGCATTTGGTAGA	PCR en temps réel	60
ARN16S-Q-For	CGTGCAGAAGCGGAGATAA	PCR en temps réel	60
ARN16S-Q-Rev	TGTCGGGCTGTTGTAGGG	PCR en temps réel	60

Tableau 2. Oligonucléotides utilisés dans l'étude de la Polμ chez *P. waltl*.

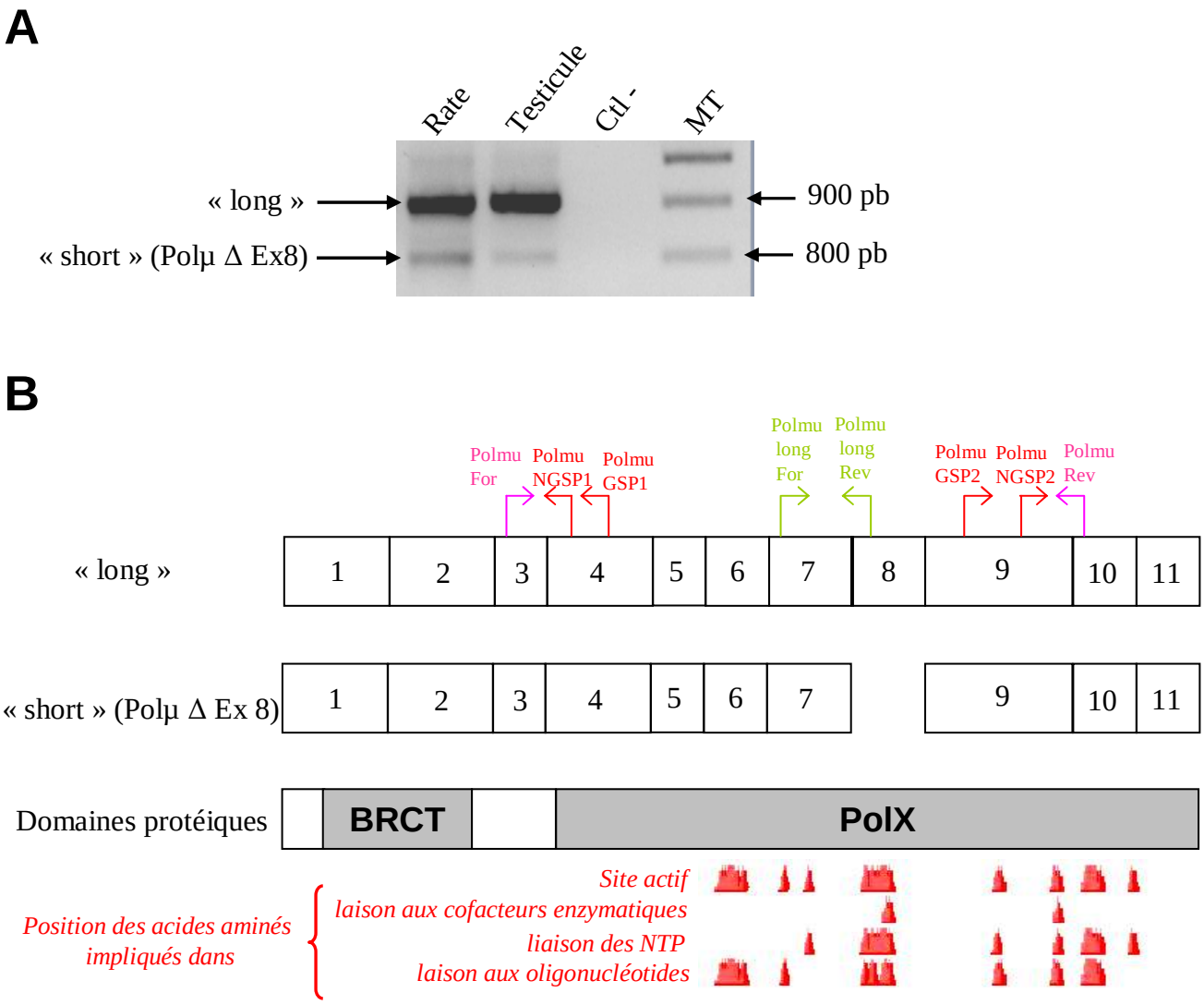


Figure 20. (A) Isoformes de la Polμ chez *P. waltl*. L'isoforme courte (« short ») présente une délétion de 103 paires de bases, correspondant à la délétion de l'exon 8 (Polμ Δ Ex8). Cette isoforme courte représente 16% des transcrits de la DNA Polμ dans la rate et 6% dans le testicule. MT = marqueur de poids moléculaire.
(B) Structure de l'ADNc de la DNA Polμ chez *P. waltl*. L'isoforme courte (« short ») aboutit à une protéine Polμ tronquée, non fonctionnelle puisqu'elle ne possède pas la totalité du site actif de l'enzyme. Les flèches représentent les positions des amorces utilisées (table 1).

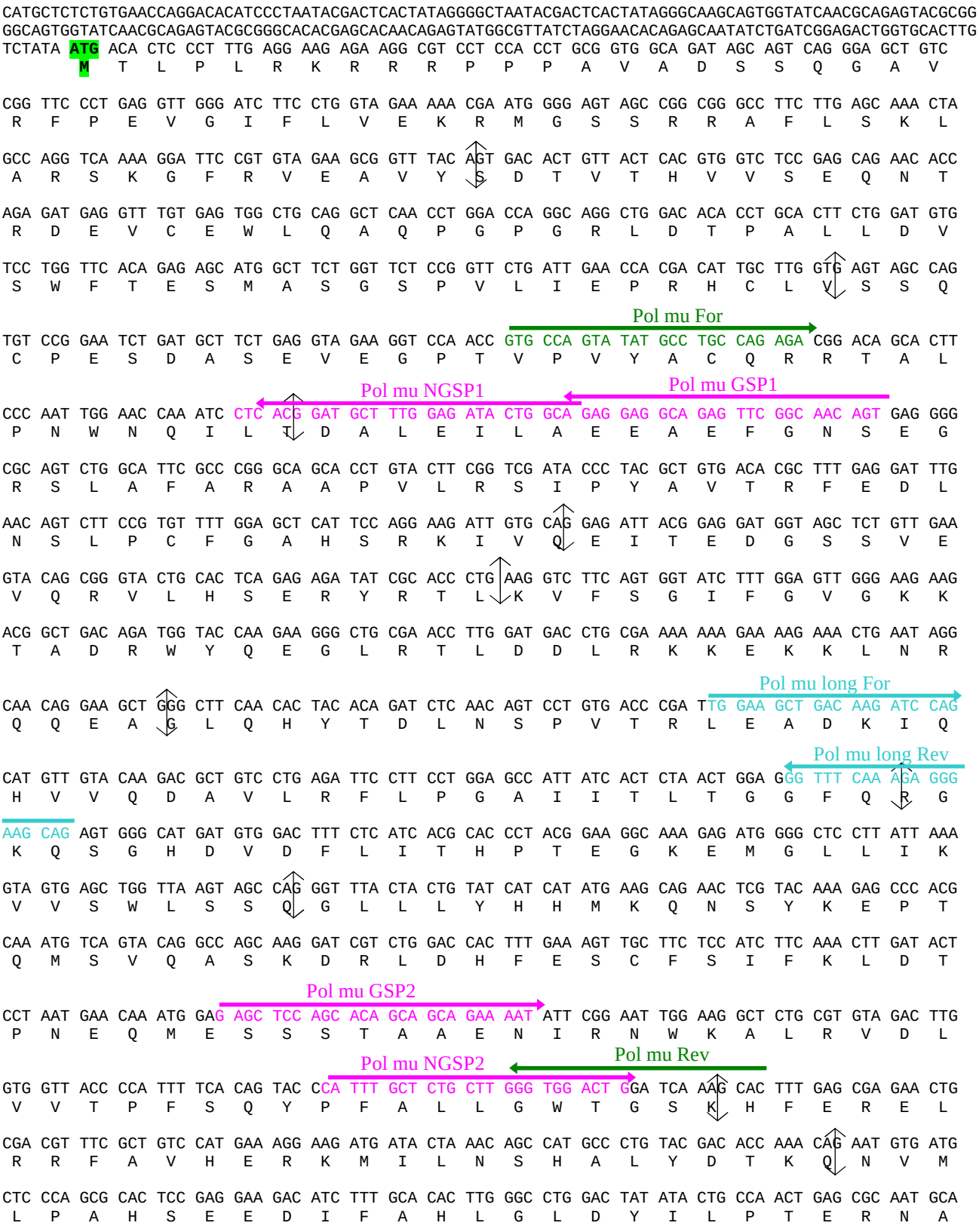


Figure 21. Séquence nucléotidique et peptidique de la Polμ chez *P. waltl*. Les codons « start » et « stop » sont indiqués en gras et sont surlignés en vert. Les jonctions entre deux exons sont indiquées par des doubles flèches verticales. Il existe un site unique de polyadénylation (souligné). Les flèches horizontales indiquent la position des oligonucléotides utilisés dans cette étude, dont les séquences sont indiquées dans le tableau 2.

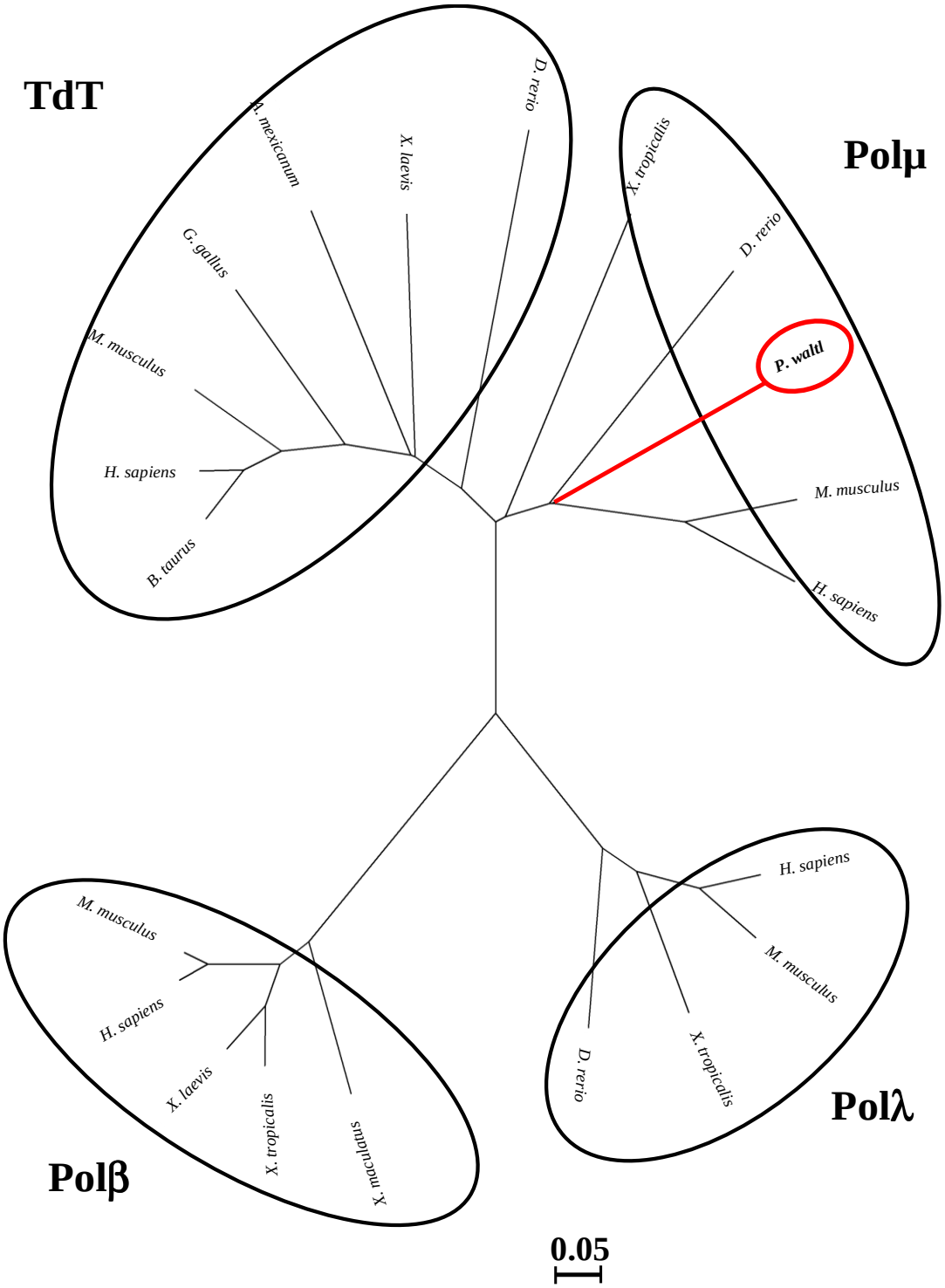


Figure 22. Arbre phylogénétique des polymérases de la famille PolX, construit à l'aide du logiciel MEGA4 à partir des séquences peptidiques suivantes : **Terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)**; *Bos taurus* (DAA14763), *Homo sapiens* (BAB72001), *Mus musculus* (NP_001036693), *Gallus gallus* (NP_990720), *Ambystoma mexicanum* (AA092254), *Xenopus laevis* (NP_001079251), *Danio rerio* (AAS89780). **Polymerase beta**; Mus musculus (NP_035260), *Homo sapiens* (NP_002681), *Xenopus laevis* (NP_001081643), *Xenopus tropicalis* (AAH74537), *Xiphophorus maculatus* (AAU11319). **Polymerase lambda**; *Danio rerio* (NP_998408), *Xenopus tropicalis* (NP_001093716), *Mus musculus* (NP_064416), *Homo sapiens* (NP_001167555). **Polymerase mu**; *Homo sapiens* (NP_037416), *Mus musculus* (NP_059097), *Danio rerio* (NP_956542), *Xenopus tropicalis* (NP_001164987). La barre d'échelle correspond à la distance d'évolution.

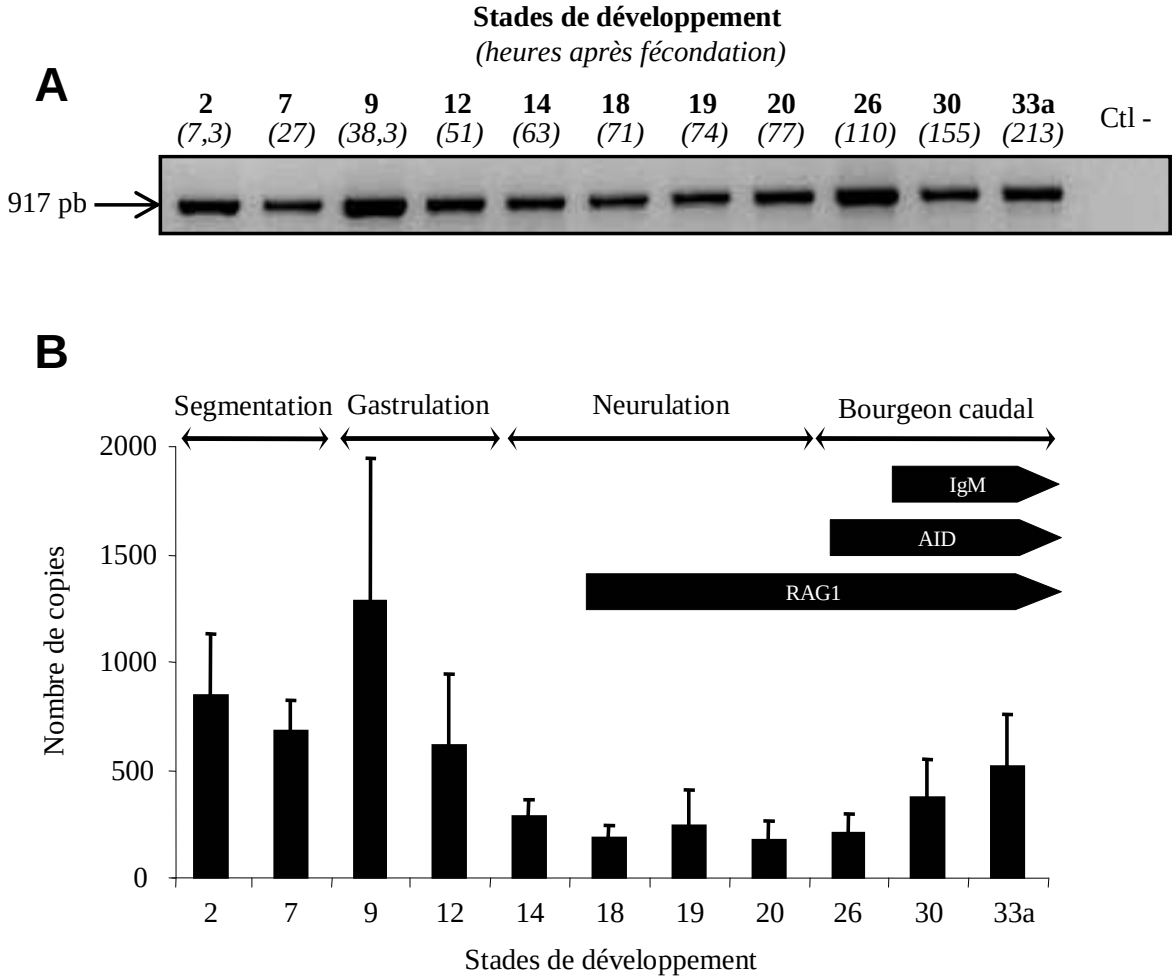


Figure 23. Expression de l'ARNm de la Polμ durant le développement précoce de *P. waltl*.
(A) Amplifications en conditions saturantes de l'ADNc de la Polμ à différents stades de développement.
(B) Expression absolue (nombre de copies) de l'ADNc Polμ à différents stades de développement. Les flèches noires désignent l'expression des chaînes lourdes d'IgM ainsi que des protéines AID et Rag1. Notons que la quanfication relative des transcrits n'a pas été possible car la variabilité de l'expression des gènes de ménage telles que la GAPDH ou l'α-actine durant le développement précoce est trop importante.

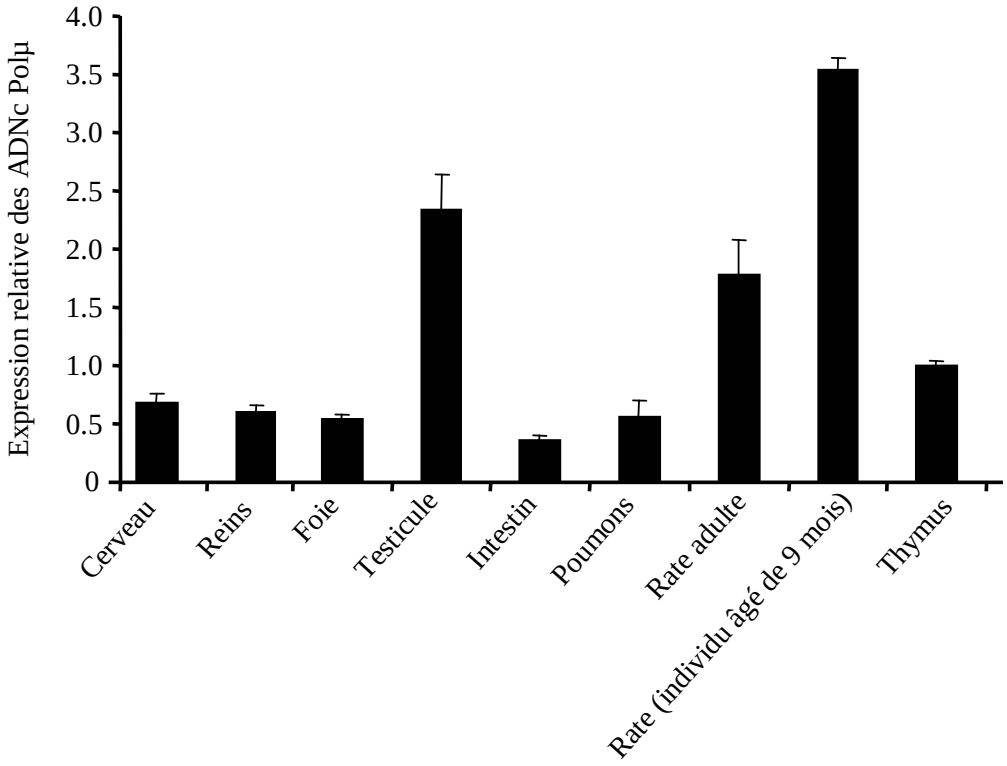


Figure 24. Expression relative de l'ADNc Polμ dans différents organes de *P. waltl* adulte. Les oligonucléotides utilisés pour quantifier les ADNc ont été définis sur des jonctions exon-exon pour éviter l'amplification d'éventuelles traces d'ADN génomique. Les quantifications dans les différents organes ont été effectuées en triplicat et les PCR répétées 2 fois. Les histogrammes représentent l'expression relative des ADNc Polμ par rapport à l'expression de des ADNc de 4 gènes de référence (GAPDH, α-actine, TafII et ARN16S). La valeur relative obtenue pour le thymus a été fixée arbitrairement à 1 comme valeur de référence. Les histogrammes représentent la moyenne ± erreur standard à la moyenne.

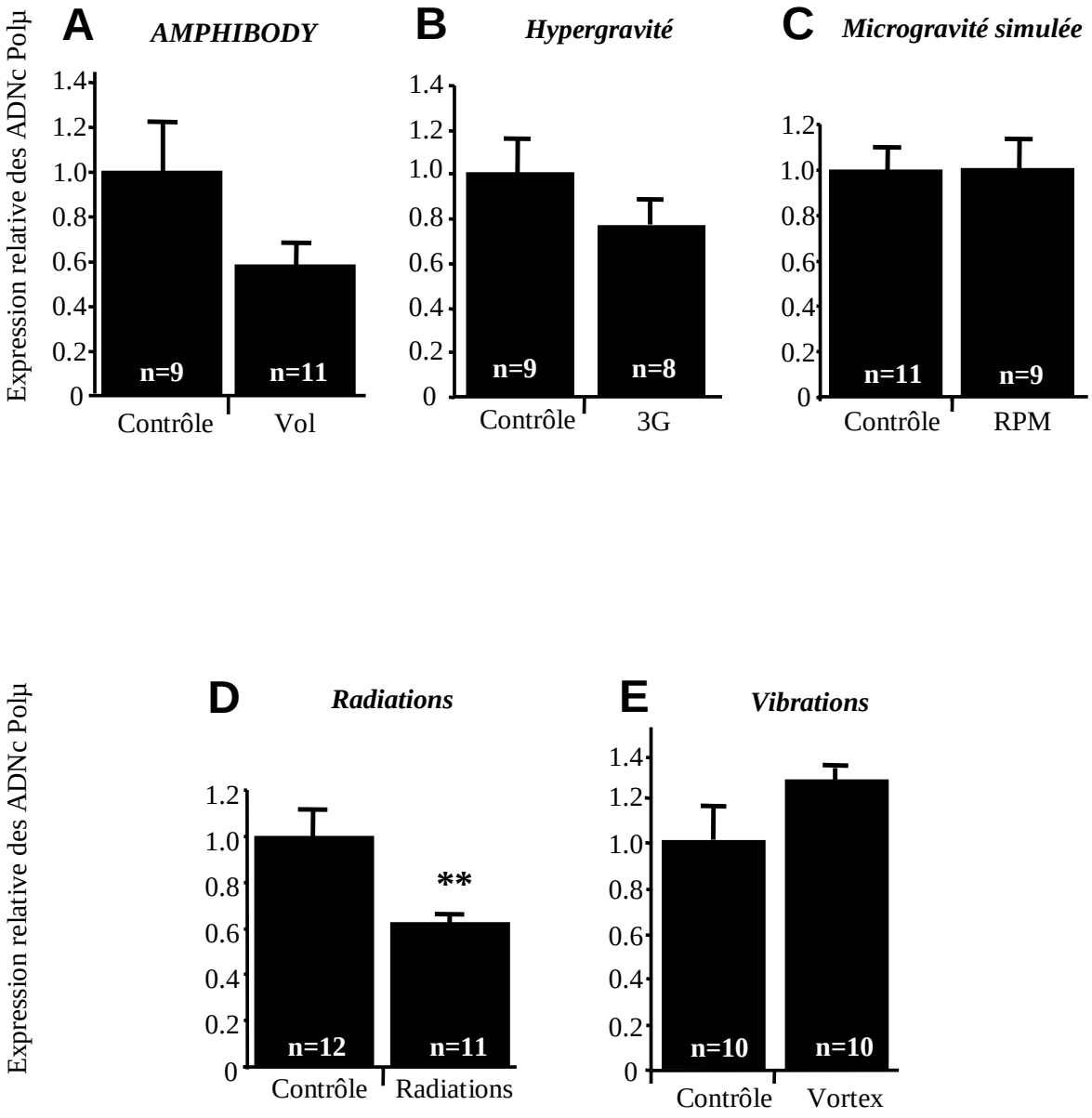


Figure 25. Expression relative de l'ADNc Polμ des larves de *P. waltl* qui se sont développées dans l'ISS *(AMPHIBODY)*, en hypergravité (3G), en microgravité simulée (RPM) ou qui ont été exposées aux radiations spatiales ou à des vibrations. Les oligonucléotides utilisés pour quantifier les ADNc Polμ ont été définis sur des jonctions exon-exon pour éviter l'amplification à partir d'éventuelles traces d'ADN génomique. Les quantifications ont été effectuées en triplicat et les PCR répétées 2 fois. Les histogrammes représentent l'expression relative des ADNc Polμ par rapport à l'expression des ADNc de 4 gènes de référence (GAPDH, α-actine, TafII et ARN16S mitochondrial). La valeur relative moyenne obtenue pour le groupe contrôle de chaque expérience a été fixée arbitrairement à 1 comme valeur de référence. Les valeurs représentent la moyenne ± erreur standard à la moyenne. Le test t de Student a été utilisé pour comparer l'expression relative du taux de transcrits entre les groupes de chaque experience. **: $p<0,01$.

Identification du transcrit de la molécule C3 du complément chez *P. waltl* et étude de son expression suite à des stress rencontrés lors de vols spatiaux

1. Introduction

Les 3 voies d'activation du complément (la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne) permettent la formation de convertases capables de cliver la molécule C3. Cette molécule a donc un rôle central dans la cascade d'activation du complément. Une fois la protéine C3 clivée, la petite protéine soluble C3a est libérée et agit comme médiateur de l'inflammation. C'est une anaphylatoxine (Bokisch *et al.*, 1969) qui permet d'attirer les polynucléaires neutrophiles au niveau du site d'activation du complément (Frank & Fries, 1991). Le fragment majeur C3b, quant à lui, va pouvoir se lier de manière covalente à la surface de la cellule-cible grâce à un pont thioester (Law *et al.*, 1981). Cette liaison va permettre d'une part l'auto-amplification de la voie alterne (Müller-Eberhard & Götze, 1972), nécessaire à l'opsonisation du pathogène, et d'autre part la formation des convertases de la molécule C5. Les convertases de C5 formées vont être à l'origine de la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) qui permettra la lyse osmotique de la cellule-cible (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1991 ; Esser, 1991 ; **fig. 2**).

La molécule C3 du complément a donc un rôle central dans le système du complément qui est nécessaire à la défense de l'organisme contre les infections. Cette molécule est un membre de la famille des α2-macroglubulines. Les protéines de cette famille ont été identifiées chez de nombreuses espèces animales (des insectes aux mammifères). Elles possèdent toutes 1400 à 1800 acides aminés et sont capables de former une liaison covalente (liaison thioester) avec une particule-cible. La protéine C3 a été largement étudiée chez de nombreuses espèces (Goldberger *et al.*, 1981 ; Domdey *et al.*, 1982 ; Becherer *et al.*, 1990 ; Fujii *et al.*, 1995 ; Castillo *et al.*, 2009 ; Qi *et al.*, 2011).

Des stress environnementaux, à l'origine de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont capables de provoquer des dommages cellulaires tels que la péroxydation lipidique, des cassures dans l'ADN ou encore une oxydation des protéines cellulaires. Or un stress oxydatif est souvent observé suite à une exposition à des radiations telles que celles subies lors d'un vol spatial (Stein & Leskiw, 2000 ; Stein, 2002 ; Wan *et al.*, 2005). En effet, il a par exemple pu être observé, suite à un vol spatial, une augmentation de la péroxydation lipidique des érythrocytes humains et une réduction du taux de molécules

antioxydantes circulantes (Stein, 2002). De plus, la concentration urinaire du 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (un marqueur des dommages oxydatifs causés au niveau de l'ADN) est significativement plus élevée et le taux de la superoxyde dismutase des globules rouges est diminué suite à un vol spatial de longue durée chez l'homme (Smith & Zwart, 2008). Ces observations sont renforcées par le fait que Baqai *et al.*, (2009) ont observé une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'élimination des ERO suite à un vol spatial chez la souris.

Bien que les vols spatiaux impliquent l'exposition aux radiations ionisantes et donc la formation d'ERO, d'autres types de stress, physiques ou phychosociaux (exposition au froid, contention, isolement social) sont responsables de l'augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase chez le rat (Stojiljković *et al.*, 2005). Les organismes aquatiques sont aussi sensibles à la production d'ERO engendrés par des stress environnementaux (Wang *et al.*, 2009 ; An & Choi, 2010). Or, il a été montré que l'activation de la cascade du complément peut être engendrée par des stress oxydatifs (Collard *et al.*, 1997). La molécule C3 du complément est particulièrement impliquée car à la fois la voie classique et la voie des lectines sont concernées (Collard *et al.*, 1997 ; 2000) par les altérations tissulaires faisant suite à la production d'ERO (Hart *et al*., 2004). De plus, Qi *et al.* (2011) ont observé une augmentation de la transcription de C3 chez le poisson *Epinephelus coioides* lors d'une exposition à une baisse de température ou à une modification du pH environnemental. Ces observations montrent donc que différents stress peuvent être responsables de la production d'ERO et de l'augmentation de la production de molécules du complément.

Dans cette étude, nous avons tout d'abord caractérisé et séquencé le transcrit C3 de l'amphibien *P. waltl*. Nous avons ensuite traduit *in silico* la séquence obtenue afin de déterminer la séquence peptidique pour laquelle il code. Puis nous avons défini des amorces de PCR quantitative en temps réel et quantifié les transcrits C3 afin de connaître son profil d'expression durant le développement précoce ainsi que dans différents organes adultes chez cet animal. Nous avons également quantifié sa transcription dans des larves de pleurodèle ayant subi différents stress. Enfin, nous avons quantifié les transcrits C3 présents dans les hépatocytes de souris exposées à différents niveaux d'hypergravité (2G ou 3G) ou à une suspension anti-orthostatique (qui permet de mimer les effets de la microgravité sur l'organisme) durant 21 jours ; ceci dans le but d'observer les effets de stress associés à un vol spatial sur la transcription du gène codant cette molécule.

2. Résultats et discussion

2.1. Identification de l'ADNc de C3 chez *P. waltl*

Afin d'isoler un fragment de l'ADNc de C3 chez *P. waltl*, nous avons aligné les séquences des ADNc correspondant de plusieurs espèces (homme, poulet, xénope, truite, lamproie) pour définir dans des zones conservées les oligonucléotides C3-For et C3-Rev (**tableau 3**). Ces amorces ont permi d'isoler par PCR un fragment de C3 de 1316 pb.

Nous avons ensuite défini, au sein de cette séquence, des oligonucléotides permettant de faire des RACE-PCR 5' et 3' (C3-GSP1, C3-NGSP1, C3-GSP2 et C3-NGSP2) dans le but d'obtenir la totalité de la séquence de l'ADNc de C3 chez *P. waltl*. Ainsi, nous avons obtenu par PCR un fragment d'environ 2 kb suite à la 5'RACE-PCR et un fragment d'environ 3,5 kb suite à la 3'RACE-PCR. Ces deux produits ont été clonés et séquencés. L'ADNc de C3 chez *P. waltl* présente une homologie d'environ 60 à 65% avec les séquences d'ADNc C3 de nombreuses autres espèces animales (données non montrées).

La traduction *in silico* de la séquence obtenue, grâce au programme transeq (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::transeq), a permi d'identifier une phase ouverte de lecture de 4914 bases codant une protéine de 1637 acides aminés. Cette séquence peptidique ne possède qu'un site d'initiation de la traduction et qu'un seul codon stop (**annexe 1**), et présente une homologie de 45 à 55% avec les séquences peptidiques C3 de nombreuses espèces (données non montrées). La longueur du transcrit et de la protéine chez *P. waltl* sont sensiblement identiques à celles d'autres espèces. En effet, l'homme, le poulet, le xénope, le cobra, la lamproie, la truite et le médaka possèdent tous une protéine C3 d'environ 1650 acides aminés codée par 41 exons. Aucune isoforme n'a été décelée chez *P. waltl*.

Au sein de la séquence peptidique obtenue *in silico*, plusieurs domaines conservés ont été identifiés par alignement avec des séquences peptidiques de C3 d'autres espèces. En effet, la séquence obtenue chez *P. waltl* possède 6 domaines spécifiques de la famille des α2-macroglobulines, un domaine « anaphylatoxine » responsable de la réaction inflammatoire, ainsi qu'un domaine spécifique aux protéines C3, C4 et C5 du complément (**fig. 26**). Notre séquence possède le motif très conservé RXXR ([RRRR] chez *P. waltl* en position 662-665) qui est le site de clivage de la protéine en chaînes α et β. Le site de clivage par une C3 convertase est également identifié chez *P. waltl.* En effet, le motif [LFLARSEVEE] en position 737-746 (dans la moitié N-terminale de la chaîne α) est identifié comme le site-cible des C3 convertases qui clivent entre les résidus R et S. Ce clivage de C3 permet d'obtenir un peptide C3a de 76 acides aminés, de taille similaire aux C3a d'autres espèces (78 acides

aminés par exemple chez l'homme ou la souris (Domdey *et al.*, 1982)). Ce peptide C3a contient alors le domaine « anaphylatoxine ». Chez *P. waltl*, ce domaine possède les acides aminés très conservés indispensables à la fonction pro-inflammatoire de la protéine C3a (Qi *et al.*, 2011). Le motif thioester [GCGEQ] est également très conservé entre espèces. Il est présent chez *P. waltl* dans la partie N-terminale du domaine spécifique aux protéines C3-C4-C5, en position 1003-1007 (**fig. 26**). Ce motif permet la liaison covalente de la protéine à la membrane de la cellule-cible (Law & Dodds, 1997).

Enfin, afin de s'assurer que nous avons bien isolé et séquencé l'ADNc de C3 du pleurodèle et non un ADNc de séquence proche (C4 ou C5 qui sont les molécules les plus proches), nous avons construit un arbre phylogénétique à partir des séquences peptidiques C3, C4 et C5 de plusieurs espèces. La position de la séquence obtenue chez *P. waltl* prouve que nous avons bien isolé l'ADNc de C3 du pleurodèle (**fig. 27**).

2.2. Expression de C3 durant le développement précoce de *P. waltl*

La **figure 28** montre l'expression du transcrit C3 durant le développement précoce de *P. waltl* par PCR en point final (**A**) ou par PCR quantitative en temps réel (**B**). Nous observons ainsi que lors de la segmentation (stades 1 à 7), le transcrit C3 n'est pas exprimé. Son expression débute lors de la gastrulation (stades 9 à 12), augmente au cours de la neurulation (stades 14 à 20) et s'intensifie au cours des stades du bourgeon caudal (stades 22 à 33a) car c'est à cette étape du développement de l'animal que se forme le tube digestif, donc que se différencient les premières cellules de l'ébauche hépatique, organe majoritairement responsable de l'expression des molécules du complément. Notons que la quantification du transcrit C3 au cours du développement s'est faite de manière absolue, sans tenir compte de l'expression des transcrits des gènes de ménage car l'expression de ces derniers est trop variable au cours du développement précoce de l'animal.

2.3. Profil d'expression de l'ARNm C3 chez *P. waltl* adulte

Nous avons quantifié l'expression de l'ADNc C3 chez *P. waltl* par RT-PCR quantitative en temps réel dans différents organes adultes. Cette quantification a été relativisée par rapport à l'expression des ARNm de 4 gènes de ménage (GAPDH, α-actine, TafII et l'ARN16S mitochondrial) dont les amorces sont présentées dans le **tableau 3**. Nous avons observé une très forte expression du transcrit C3 dans le foie ce qui confirme que cet organe est, comme chez tous les vertébrés, le principal producteur de molécules du complément. Une faible expression est retrouvée dans les poumons (moins de 10% de

l'expression hépatique, **fig. 29**) et en moindre mesure encore dans l'intestin, les reins ou les testicules (moins de 2% de l'expression hépatique, **fig. 29**). Cette expression n'est pas observable dans les autres organes étudiés (rate, thymus, cerveau, peau, cœur, muscle).

2.4. Expression des transcrits C3 chez des larves de *P. waltl* exposées à différents stress rencontrés lors d'un vol spatial

Nous avons quantifié les ADNc C3 dans des larves de *P. waltl* ayant séjourné 10 jours dans l'ISS (expérience AMPHIBODY), 10 jours à 3G (expérience hypergravité) ou 10 jours en microgravité simulée (10^{-2G}) dans une RPM (**fig. 30**). Cette quantification a été effectuée par PCR quantitative en temps réel et rapportée à l'expression des ADNc des 4 gènes de ménage cités ci-dessus. L'expression moyenne du groupe de larves contrôle a été fixée arbitrairement à 1 et sert de valeur de référence pour chaque expérience. Aucune différence statistique de l'expression relative de l'ADNc C3 n'a été observée suite au séjour dans l'ISS (**fig. 30A** ; p=0,465 ; test de Mann-Whitney) ou à l'hypergravité à 3G (**fig. 30B** ; p=0,945 ; test t). En revanche, une augmentation significative des transcrits C3 a été constatée suite à la microgravité simulée (**fig. 30C** ; p=0,049 ; test de Mann-Whitney).

Nous avons quantifié de la même manière les ADNc C3 dans des larves soumises à d'autres stress rencontrés lors d'un vol spatial : un choc thermique de 30°C durant 24 heures, une simulation des radiations subies lors de l'expérience AMPHIBODY réalisée à bord de l'ISS, un stress de confinement (pendant 14 heures) ainsi que des vibrations (15 Hz pendant 5 heures). Nous avons ainsi observé une très nette augmentation des transcrits C3 suite au choc thermique (**fig. 30D** ; p=0,001 ; test t) ou au confinement (**fig. 30E**, p=0,019 ; test t). En revanche, les vibrations ont provoqué une baisse de la transcription de C3 (**fig. 30F** ; p=0,010 ; test t). L'augmentation de transcription de C3 chez les larves soumises à la microgravité simulée (RPM), au choc thermique ou au confinement est attribuable au développement d'une réaction inflammatoire. Par contre, il est surprenant de ne pas constater une modification de l'expression relative du transcrit C3 suite aux radiations, puisqu'il a été montré que ce type de stress est responsable de l'augmentation de l'expression de molécules du complément. En effet, les études menées par le groupe de Korbelik ont pu mettre en évidence par exemple que l'irradiation de cellules tumorales augmentaient l'expression de la protéine chaperonne Hsp70 qui se fixe sur le TLR2 et le TLR4 des macrophages infiltrés dans la tumeur, augmentant la transcription des gènes codant les protéines du complément *via* le facteur de transcription NFκB (Stott & Korbelik, 2007 ; Korbelik, 2009). Cependant, il semble que ce soit plutôt le type de radiations qui module l'expression de la molécule C3. En

effet, Terui *et al.* (2000) ont mis en évidence une augmentation de la production de la protéine C3 par des kératinocytes humains mis en culture en présence d'IFNγ et soumis à des UVB, et, au contraire, une diminution de la production de C3 lorsque ces cellules sont soumises à des UVA. Par ailleurs, sans IFNγ, aucun de ces 2 types d'UV n'influencent la production de C3 par ces cellules. Ceci tend à montrer que le type de radiation et peut-être même la dose, ainsi que l'environnement cellulaire, sont déterminants dans l'expression des gènes codant les molécules du complément. Ainsi, lors d'un vol spatial, les nombreux facteurs environnementaux capables d'induire un stress oxydatif et donc potentiellement de moduler la transcription de C3 ont sans doute des effets opposés sur la transcription de cette molécule ce qui pourrait expliquer l'absence de différence dans le taux de transcrit C3 entre le groupe expérimental et le groupe contrôle suite au vol spatial (**fig. 30A**). Les différents stress rencontrés lors d'un vol spatial (altération de la gravité, radiations, choc thermique, confinement, vibrations) ont des effets parfois opposés qui, lorsqu'ils agissent de manière simultanée durant un vol spatial, empêchent très probablement toute variation de l'expression de C3. Afin d'étayer cette hypothèse, nous pourrions soumettre des larves de pleurodèle simultanément à deux stress (un qui permet l'augmentation des transcrits C3 et l'autre une diminution, par exemple un stress de confinement associé à des vibrations) et ensuite quantifier les transcrits C3.

2.5. Expression des transcrits C3 après exposition de souris à 2 modèles d'altération de la gravité

Des souris C57Bl/6 mâles âgés de 8 semaines ont été soumises durant 21 jours à 2 niveaux d'hypergravité (2G et 3G) ainsi qu'à un modèle mimant les effets de la microgravité sur l'organisme : la suspension anti-orthostatique. A la fin de l'expérience, ces souris ont été sacrifiées et nous avons quantifié les transcrits C3 dans le foie de ces souris par PCR quantitative en temps réel par rapport à l'expression des transcrits de 4 gènes de ménage (codants la cyclophiline, le facteur d'élongation Eef2, une protéine ribosomale (Rpl13) ainsi qu'une protéine d'initiation de la traduction : Eif3f). Les amorces utilisées sont décrites dans le **tableau 3**. L'expression moyenne observée dans le groupe de souris contrôle a été fixée arbitrairement à 1 et a servi de valeur de référence pour chaque expérience. Aucune différence statistique dans le taux de transcription de C3 n'a été observée suite à 21 jours d'hypergravité (**fig. 31A et B** ; 2G et 3G ; p=0,169 et p=0,929 respectivement ; test t), ni après 21 jours de suspension anti-orthostatique (**fig. 31C** ; p=0,983 ; test t).

Donc, comme chez les larves de *P. waltl*, la transcription de C3 n'est pas influencée par l'hypergravité. En revanche, si la microgravité simulée modifie l'expression de C3 chez *P. waltl*, ce n'est pas le cas chez la souris. Le modèle animal, la méthode utilisée ainsi que la durée d'exposition pour simuler la microgravité n'étant pas la même, il nous est difficile de comparer les résultats. De plus, la RPM peut induire des chocs biomécaniques qui n'existent pas chez les souris soumises à une suspension anti-orthostatique. La RPM et la suspension peuvent donc induire des réponses différentes.

3. Conclusion

Chez *P. waltl*, l'expression de l'ARNm C3 augmente significativement dès le début de la formation du tube digestif, ce qui concorde avec la présence des premières cellules de l'ébauche hépatique, organe majoritaire de synthèse des molécules du complément. D'ailleurs, chez le pleurodèle adulte, C3 est presque exclusivement exprimé dans le foie. D'autres organes expriment C3 mais à des quantités faibles par rapport à l'expression hépatique.

Un vol spatial ou l'exposition à l'hypergravité n'influence pas la transcription de C3. En revanche, la microgravité simulée ou encore d'autres stress tels que le confinement, le choc thermique ou encore les vibrations modulent l'expression de C3. Certaines études ont pu mettre en évidence l'influence des facteurs environnementaux et du type de stress sur la variation de l'expression de C3. Dans notre étude, certains de ces stress associés à un vol spatial augmentent la transcription de cette molécule alors que d'autres stress la diminuent. Tous confondus lors d'un vol spatial, nous n'observons donc plus de différence dans la transcription du gène C3.

Chez des souris soumises à deux niveaux d'hypergravité (2G ou 3G) ou à la suspension anti-orthostatique, aucune modification de l'expression des transcrits C3 n'est observable. Cela ne concorde donc pas avec les résultats obtenus chez les larves soumises à la microgravité simulée dans la RPM. Cependant, le modèle animal, l'âge des animaux ainsi que le modèle de microgravité simulée utilisée étant différents, il est difficile d'effectuer une comparaison de ces résultats. Ces données montrent que des résultats différents peuvent être obtenus selon les modèles utilisés pour mimer la microgravité.

Figures et tableau concerant l'étude de C3

Nom	Séquence (5' → 3')	Type	Température d'hybridation (°C)
C3-For	CCCAAATACTTCAAGCCTGGAATGCC	PCR	55
C3-Rev	TCCCAGGTGGTGATGGAATCT	PCR	55
C3-GSP1	TGTTGGCACCACCGCCAGGAGTGCATCC	5'-RACE-PCR	68
C3-NGSP1	GTCATTCTTCTCCACAGAGTCCCAAACC	5'-RACE-PCR	68
C3-GSP2	CAAGAGAGGCAGCGGGGACAGTCGCTGG	3'-RACE-PCR	68
C3-NGSP2	GACAATGACACTGCCTATCGTTCCAGA	3'-RACE-PCR	68
C3-Q-For	TGGTGACAATGACACTGCCT	PCR quantitative	62
C3-Q-Rev	CATCCACCCAGATGGAGTCT	PCR quantitative	62
GAPDH-Q-For	GAAGGTAGTAAGCAACGCCTCCT	PCR quantitative	65
GAPDH-Q-Rev	CACAGCATGTACAGTGGTCATCA	PCR quantitative	65
Actine-Q-For	TGGTCGTGACCTGACTGATT	PCR quantitative	60
Actine-Q-Rev	TCACGGACAATCTCACGTTC	PCR quantitative	60
Taf2-Q-For	TTCACGAGCTGTCTGTGGAG	PCR quantitative	60
Taf2-Q-Rev	CCTGGGAAGCATTTGGTAGA	PCR quantitative	60
ARN16S-Q-For	CGTGCAGAAGCGGAGATAA	PCR quantitative	60
ARN16S-Q-Rev	TGTCGGGCTGTTGTAGGG	PCR quantitative	60
C3-Q-Mus-For	AGAGGCAAGTGCTGACCAGT	PCR quantitative	62
C3-Q-Mus-Rev	ACTGGCTGGAATCTTGATGG	PCR quantitative	62
Ppia-Q-Mus-For	GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC	PCR quantitative	58
Ppia-Q-Mus-Rev	GCGTGTAAAGTCACCACCCT	PCR quantitative	58
Eef2-Q-Mus-For	GTGGTGGACTGTGTGTCTGG	PCR quantitative	58
Eef2-Q-Mus-Rev	CGCTGGAAGGTCTGGTAGAG	PCR quantitative	58
Rpl13-Q-Mus-For	GGAAGCGGATGAATACCAAC	PCR quantitative	61
Rpl13-Q-Mus-Rev	CTTGTCATAGGGTGGAGGGA	PCR quantitative	61
Eif3f-Q-Mus-For	CATCAAGGCCTATGTCAGCA	PCR quantitative	61
Eif3f-Q-Mus-Rev	GTGGTGGACTGTGTGTCTGG	PCR quantitative	61

Tableau 3. Oligonucléotides utilisés pour l'étude des transcrits C3 chez *P. waltl* et *M. musculus*.

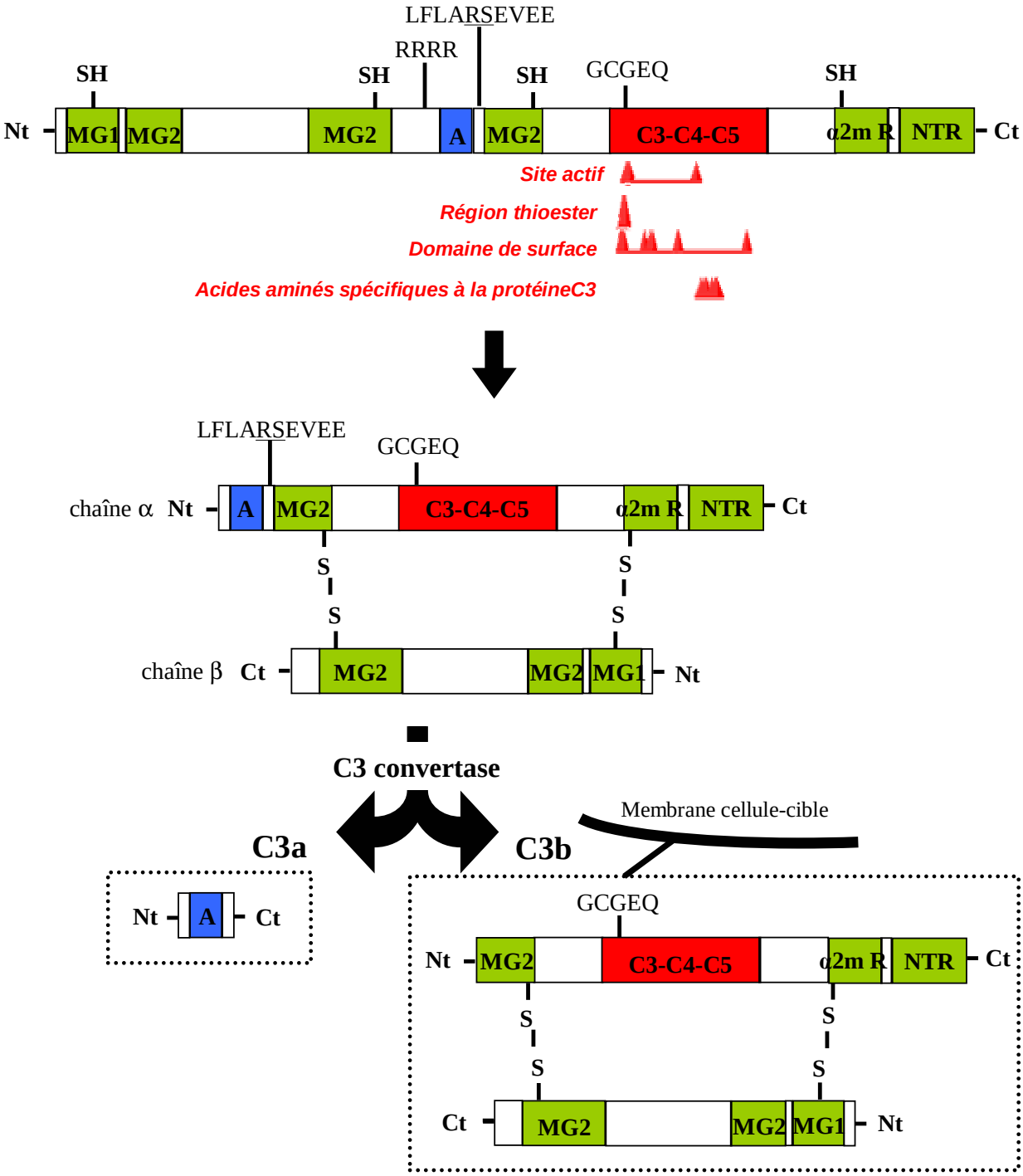


Figure 26. Organisation de la protéine C3 chez *P. waltl.*
MG1 = Domaine N-terminal α2-macroglobuline
MG2 = Domaine α2-macroglobuline
A = Domaine anaphylatoxine
C3-C4-C5 = Domaine conservé dans les protéines C3, C4 et C5.
α2m R = Domaine recepteur des α2-macroglobulines
NTR : Région N-terminal des protéines du complément C3, C4 et C5.
Les chaînes a et b de C3 sont reliées par 2 ponts disulfures. Une C3 convertase clive une petite partie de la chaîne a contenant le domaine anaphylatoxine (C3a). Le reste de la protéine (C3b) se lie alors à la membrane de la cellule cible grâce à une liason thiester.
Figure réalisée à partir de Fong *et al.*, 1990.

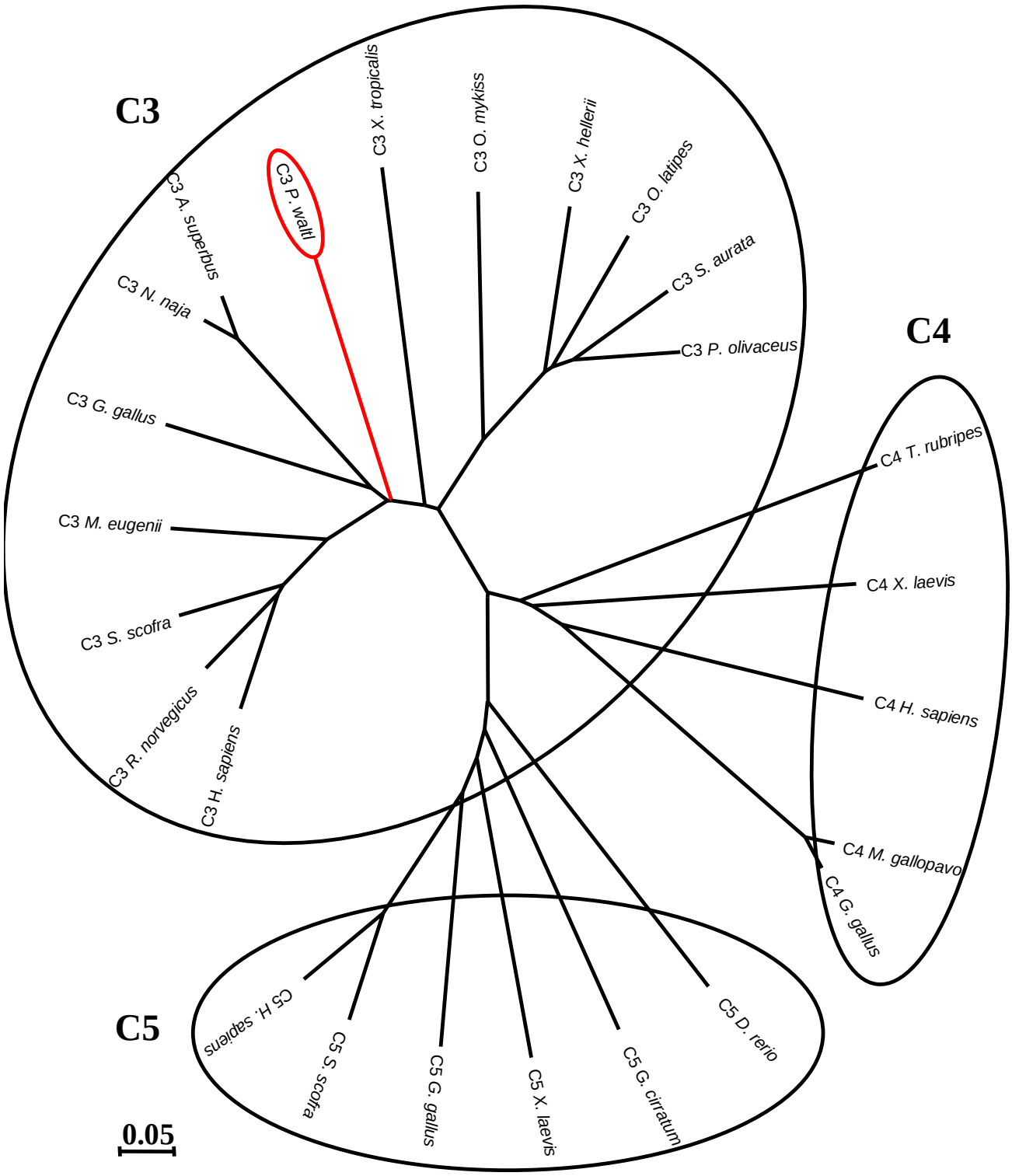


Figure 27. Arbre phylogénétique des protéines du complément C3, C4 et C5, construit avec le logiciel MEGA5 à partir des séquences peptidiques suivantes : **C3** - *Homo sapiens* (152012784), *Rattus norvegicus* (158138560), *Sus scofra* (47522843), *Macropus eugenii* (58272374), *Gallus gallus* (755815), *Naja naja* (213373), *Austrelaps superbus* (108744316), *Pleurodeles waltl*, *Xenopus tropicalis* (301621523), *Oncorhynchus mykiss* (431607), *Xiphophorus hellerii* (338808846), *Oryzias latipes* (7209634), *Sparus aurata* (303305915), *Paralichthys olivaceus* (6682835). **C4** - *Takifugu rubripes* (33386532), *Xenopus laevis* (148225411), *Homo sapiens* (356582272), *Gallus gallus* (116175421), *Meleagris gallopavo* (169730381) **C5** - *Homo sapiens* (38016946), *Sus scofra* (37677940), *Gallus gallus* (363740589), *Xenopus tropicalis* (323276611), *Ginglymostoma cirratum* (197260435), *Danio rerio* (326668227). La barre d'échelle correspond à la distance d'évolution.

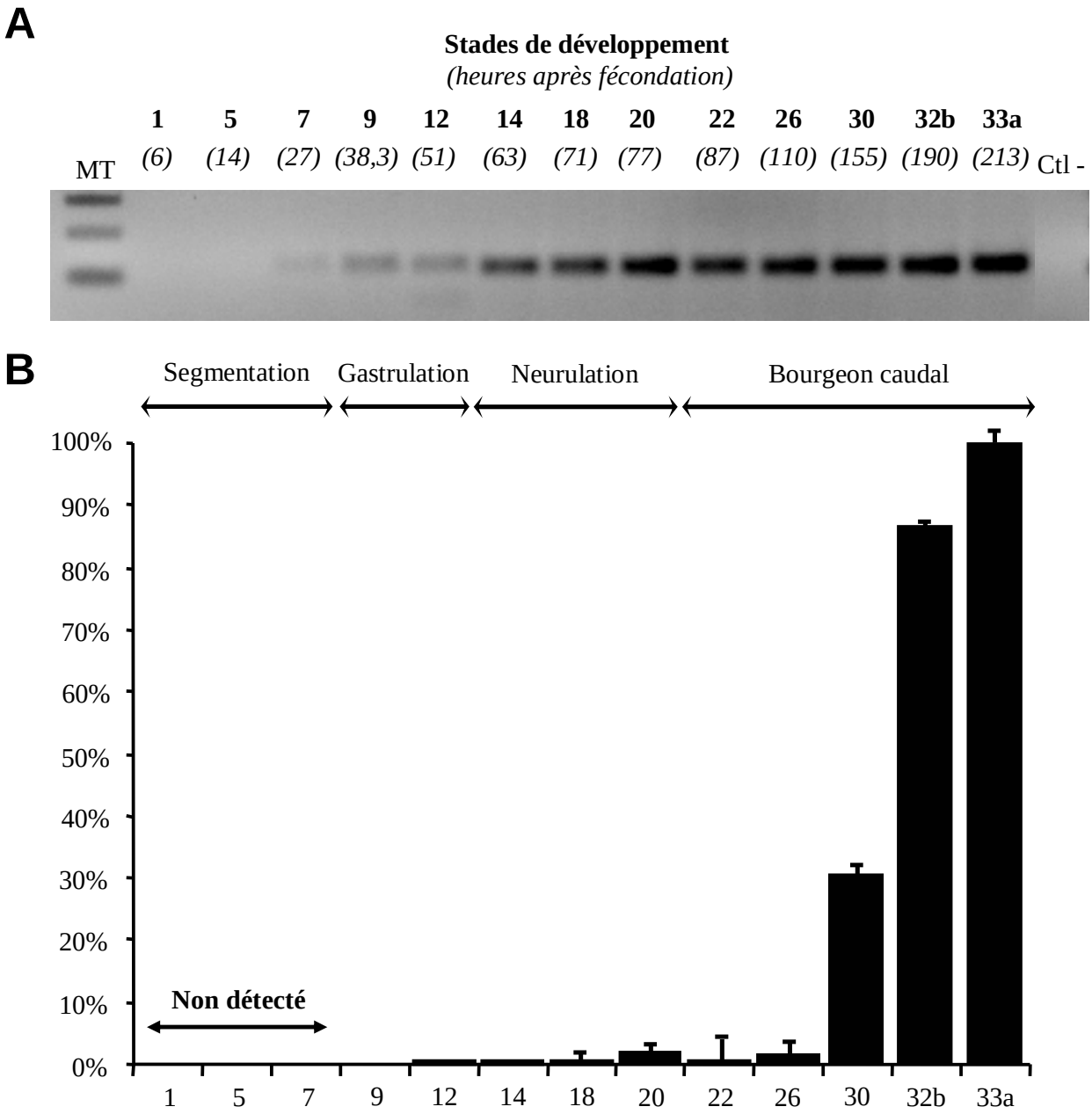


Figure 28. Expression du transcrit C3 durant le développement précoce de *P. waltl*.
(A) PCR en point final de C3 à différents stades de développement, le nombre d'heures écoulées depuis la ponte est indiqué entre parenthèses. Les amplifications ont été réalisées en utilisant les oligonucléotides décrits dans la table 2.
(B) Quantification absolue du transcrit C3 par PCR en temps réel à différents stades de développement. Les amplifications ont été réalisées en utilisant les oligonucléotides décrits dans la table 2. La valeur obtenue au stade 33a a été fixée arbitrairement à 100% comme valeur de référence. Notons que la quantification relative n'a pas été possible à cause d'une variation importante de l'expression des gènes de ménage pendant le développement de *P. waltl*.

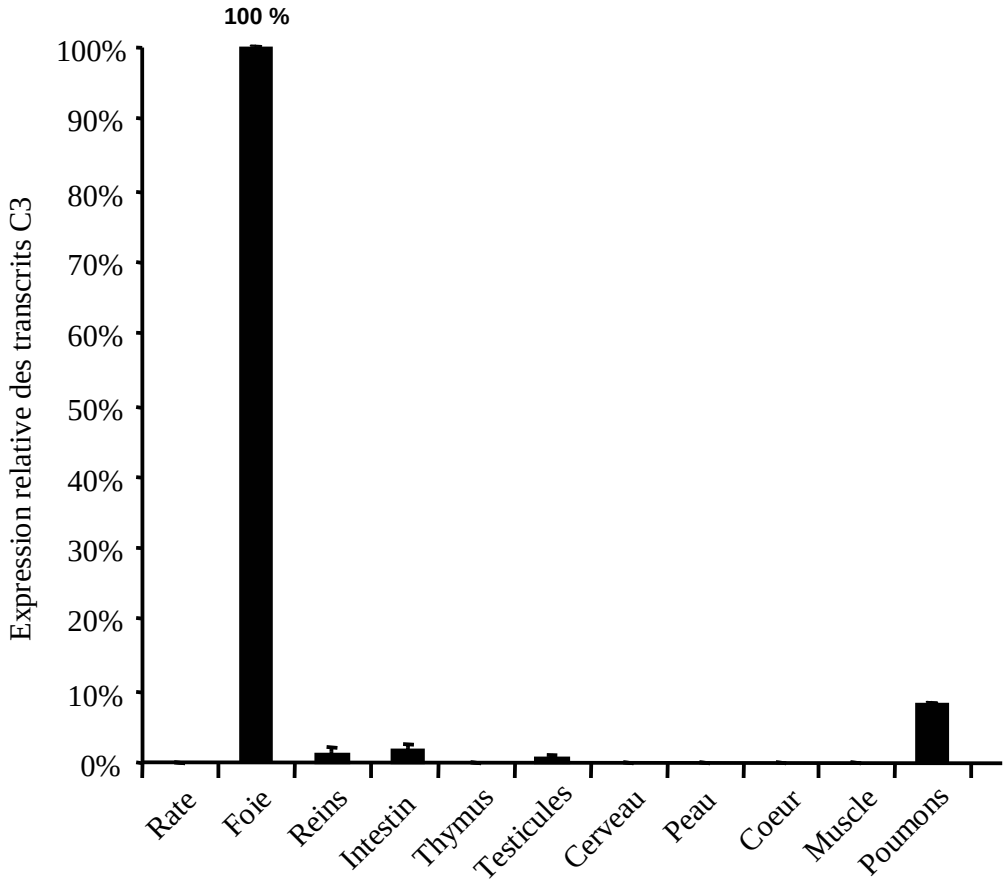


Figure 29. Expression relatve du transcrit C3 dans les organes de *P. waltl* adulte. Les oligonucléotides spécifiques de C3 et de la GAPDH ont été définis au niveau de jonctions entre deux exons pour éviter toute amplification à partir d'éventuelles traces d'ADN génomique. Les PCR quantitatives ont été effectuées en triplicat et répétées au moins deux fois. L'équation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a été utilisée pour calculer l'expression relative de C3 par rapport à l'expression des transcrits de 4 gènes de ménage (GAPDH, actine, TafII et ARN16S mitochondrial). La valeur relative obtenue avec le foie a été fixée arbitrairement à 100% comme valeur de référence. Les histogrammes présentent la moyenne ± ecart-type.

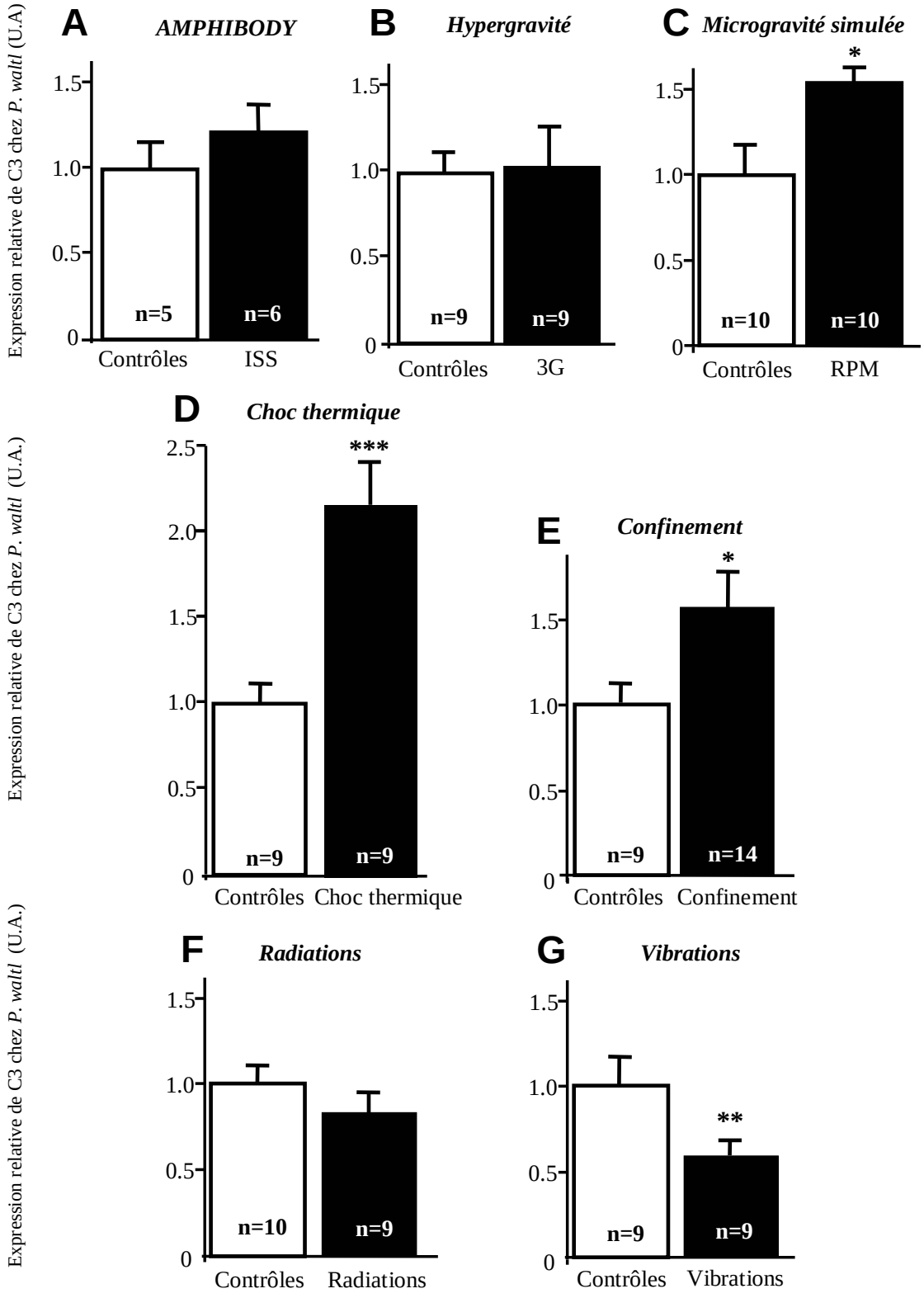


Figure 30. Quantification du transcrit C3 des larves de *P. waltl* au stade 36-37 exposées à **(A)** un vol spatial, **(B)** l'hypergravité à 3G ou **(C)** à la microgravité simulée (RPM), **(D)** à un choc thermique, **(E)** à un confinement, **(F)** à des radiations ou **(G)** à des vibrations. Les histogrammes représentent l'expression relative des ADNc C3 par rapport à l'expression des ADNc de 4 gènes de référence (GAPDH, α-actine, TafII et ARN16S mitochondrial). La valeur relative obtenue avec le groupe contrôle a été fixée arbitrairement à 1 comme valeur de référence, pour chaque expérience. Les valeurs représentent la moyenne ± erreur standard à la moyenne. * : $p<0,05$, test t de Student; ** : $p<0,01$, test t de Student.

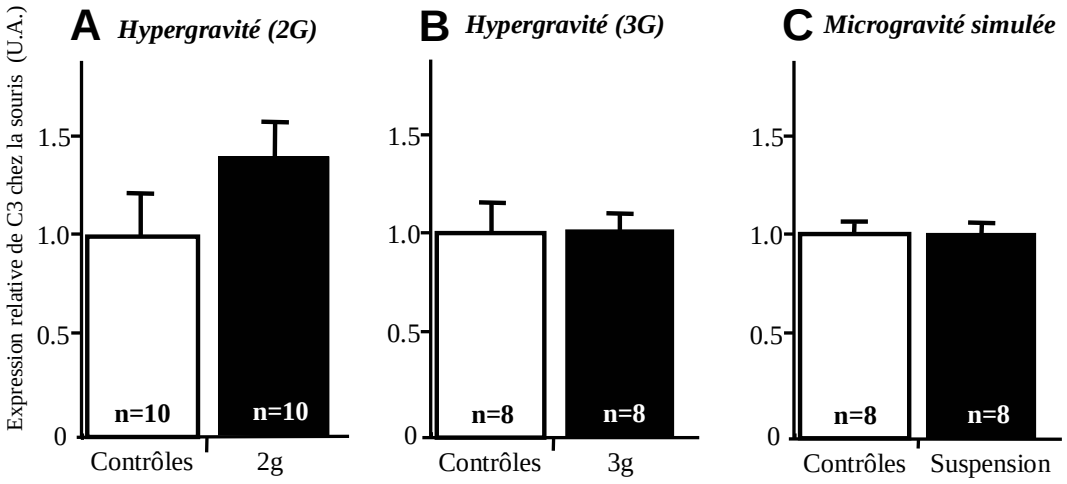


Figure 31. Quantification relative du transcrit C3 dans le foie de souris soumises durant 21 jours à l'hypergravité (2G **(A)** ou 3G **(B)**) ou à la suspension anti-orthostatique (**C**). Les histogrammes représentent l'expression relative des ADNc C3 par rapport à l'expression de ceux de 4 gènes de référence (ceux codant la cyclophiline, le facteur d'élongation Eef2, une protéine ribosomale (Rpl13) et une protéine d'initiation de la traduction Eif3f). La valeur relative obtenue avec le groupe contrôle a été fixée arbitrairement à 1 comme valeur de référence, pour chaque expérience. Les valeurs représentent la moyenne ± erreur standard à la moyenne. Aucune différence statistique n'a été observée entre les 2 groupes expérimentaux de chaque expérience en utilisant le test t de Student.

PARTIE 3

EFFETS D'UN CHANGEMENT DE LA GRAVITE SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE MURIN

Réponse au stress et modification du système immunitaire humoral lors d'une augmentation durable de la gravité chez la souris

1. Introduction

L'hypergravité, comme la microgravité simulée, permet de mimer plusieurs effets d'un vol spatial sur l'organisme, notamment l'adaptation à un nouvel environnement, une perturbation de l'équilibre ou encore les changements dans la répartition des fluides corporels. De nombreuses études ont été menées sur des organismes soumis à une microgravité simulée, telles que le « bed-rest » chez l'homme (Uchakin *et al.*, 1998 ; Schmitt *et al.*, 2000 ; Shearer *et al.*, 2009) ou le modèle de suspension anti-orthostatique chez les petits mammifères rongeurs (Sonnenfeld *et al.*, 1982 ; Felix *et al.*, 2004 ; Morey-Holton *et al.*, 2005). Le nombre d'études effectuées sur des organismes soumis à l'hypergravité est plus rare. La principale étude du système immunitaire sur des souris en hypergravité a été menée par Pecaut *et al.* (2004). Cette étude a permis de mettre en évidence des changements dans la capacité des lymphocytes à produire des cytokines ainsi que dans leur capacité de réponse à un mitogène *in vitro*. Notre étude aborde, en plus de ces paramètres, la quantité d'anticorps sériques ainsi qu'une étude de l'état de stress et d'anxiété des individus par le dosage de la corticostérone plasmatique ainsi que par des tests comportementaux.

Pour cela, nous avons soumis des souris C57Bl/6 pendant une période de 3 semaines à 2 niveaux d'hypergravité : 2G ou 3G.

2. Résultats et discussion

2.1. Marqueurs de stress physiologiques

Il est couramment accepté que le stress provoque une altération de la prise de nourriture ce qui provoque une absence de prise de masse corporelle. L'exposition à l'hypergravité provoque une hypophagie transitoire chez les souris centrifugées. Kita *et al.* (2006) ont pu montrer un effet dose dépendant de l'hypergravité sur l'altération de la prise de masse corporelle. Dans notre cas, les souris centrifugées à 2G ne présentent pas de perte de masse corporelle, contrairement aux souris centrifugées à 3G, suggérant une moins bonne adaptation au stress chez ces souris (**table 1 de la publication 5**). Bien que la masse relative de la rate ne révèle rien de significatif entre les 3 groupes de souris, la masse relative du thymus est plus faible chez les souris centrifugées à 3G que chez les 2 autres groupes de

souris (**table 1 de la publication 5**). De plus, le taux plasmatique de corticostérone est 2 fois plus élevé chez les souris centrifugées à 3G (**fig. 1 de la publication 5**). Ces résultats signifient donc que les souris centrifugées à 3G ne se sont pas adaptées au stress chronique d'hypergravité, contrairement aux souris centrifugées à 2G. Enfin, nous avons pu démontrer que des souris centrifugées à 4G ont un taux plasmatique de corticostérone encore plus élevé (données non montrées), montrant bien que le stress est dépendant du niveau de gravité.

2.2. Etat d'anxiété des animaux

Deux tests comportementaux ont permi d'étudier l'état d'anxiété des animaux : le test de la boîte claire-obscure ainsi que le test du labyrinthe en croix surélevé.

La **figure 2 de la publication 5** montre clairement un temps plus élevé avant la première entrée dans la boîte claire (**fig. 2A de la publication 5**), un nombre de transitions entre les 2 compartiments (**fig. 2B de la publication 5**) ainsi qu'un temps passé dans la boîte claire (**fig. 2C de la publication 5**) plus faible pour les souris soumises à 3G. Cela témoigne d'une anxiété plus élevée chez ces animaux, reflétant leur niveau de stress.

Les résultats acquis avec le test de la boite claire-obscure sont confirmés par le test du labyrinthe en croix surélevé. En effet, les souris ayant été centrifugées à 3G ont une activité motrice diminuée (**fig. 3A de la publication 5**) et passent plus de temps dans les branches fermées, plus sécurisantes pour l'animal, que dans les branches ouvertes ou au centre du labyrinthe (**fig. 3B de la publication 5**).

2.3. Lymphoprolifération

Nous avons testé *in vitro* la capacité des splenocytes des souris à répondre à 2 mitogènes différents : d'une part la Concanavalin A (Con A) qui est un mitogène spécifique des lymphocytes T et d'autre part le lipopolysaccharide bactérien d'*Escherichia coli* (LPS), un mitogène spécifique des LB. Nos résultats montrent que les LT des deux groupes de souris centrifugées voient leur capacité de réponse à la Con A altérée (**fig. 4A de la publication 5**). En revanche, les résultats concernant les LB sont différents : on observe une altération de la réponse proliférative de ces cellules chez les souris centrifugées à 2G mais pas chez les souris centrifugées à 3G (**fig. 4B de la publication 5**). A 2G, où le taux plasmatique de corticostérone est semblable au taux des souris contrôles, l'altération de la réponse des LT et des LB à leur mitogène respectif ne peut s'expliquer par le niveau de stress. Nous pensons que cette altération pourrait résulter de la perturbation de la distribution des fluides corporels, de l'expression des molécules d'adhésion et de la migration des lymphocytes (Sonnenfeld *et*

al., 1992 ; Cooper & Pellis, 1998 ; Pecaut *et al.*, 2003). Notons que des résultats identiques ont été obtenus avec un autre LPS bactérien, celui de *Salmonalla enterica* (données non montrées). A 3G, l'influence de la réponse au stress ne semble pas affecter la prolifération des LB, contrairement aux LT. Des études approfondies par cytométrie en flux permettront de connaître les sous-populations cellulaires affectées par l'hypergravité.

2.4. Cytokines sériques

Nous avons quantifié dans le sérum des souris 3 catégories de cytokines. D'abord, 2 cytokines pro-inflammatoires que sont MCP-1 (Monocyte Chemioattractant Protein-1) et l'IP10 (Interferon-γ induced Protein 10). Le profil de ces 2 cytokines indique une diminution de l'expression lorsque la gravité augmente, et ce de façon dose-dépendente (**fig. 5A et 5B de la publication 5**). Il est décrit dans la littérature que la corticostérone est un inhibiteur de la production de MCP-1 (Mukaida *et al.*, 1991) et plus généralement un inhibiteur de la migration des cellules pro-inflammatoires (Mizobe *et al.*, 1997). Concernant l'IP-10, des études récentes ont montré que l'expression de cette cytokine est diminuée suite à un stress (Curtin & Carroll, 2009) ou un vol spatial (Lebsack *et al.*, 2010). Ces études nous permettent donc de dire que l'expression de ces cytokines est sensible à une variation de gravité. L'IP-10 favorisant l'expression des cytokines Th1 et inhibant l'expression des cytokines Th2 (Romagnani *et al.*, 2005), nous avons dosé 2 cytokines Th1 (l'interferon-γ et l'interleukine 2) et 3 cytokines Th2 (interleukines 4, 5 et 10) dans le sérum des souris. Nos résultats montrent une diminution de la quantité des cytokines Th1 de façon gravité-dépendente (**fig. 5C et 5D de la publication 5**). Ces résultats sont en accord avec de précédentes études qui ont montré que les cytokines Th1 sont diminuées dans le sérum suite à une augmentation ou une diminution de la gravité (Konstantinova *et al.*, 1993 ; Sonnenfeld *et al.*, 1996) ainsi qu'en accord avec la quantité d'IP-10 présente dans le sérum des souris (**fig. 6B de la publication 5**). Cette altération de l'immunité cellulaire peut ainsi sérieusement compromettre les défenses immunitaires contre les pathogènes.

Par contre, nous n'avons pas observé de variation significative des cytokines Th2 dosées dans le sérum des souris (**fig. 5E, 5F et 5G de la publication 6**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Crucian *et al.* (2000) qui ont observé, chez l'homme suite à un vol spatial, une réduction du rapport IFNγ/IL10 sans modification de l'IL4. Ainsi, il semblerait que les cytokines activant les cellules de l'immunité humorale soient moins affectées par une augmentation de la gravité que les cytokines activant les cellules de l'immunité cellulaire.

2.5. Immunoglobulines sériques

Enfin, nous avons terminé notre étude en quantifiant dans le sérum des souris 3 isotypes d'anticorps : les IgM, les IgG et les IgA. Aucune modification du taux sérique n'est constatée pour les IgM (**fig. 6A de la publication 5**). Ce résultat est en accord avec celui acquis précédemment par le laboratoire chez l'amphibien *P. waltl* suite à une immunisation durant un vol spatial de 5 mois à bord de la station Mir (Boxio *et al.*, 2005). En ce qui concerne les IgA, une légère augmentation est constatée dans le sérum des souris centrifugées à 2G ou à 3G. Ce résultat est également en accord avec ceux obtenus avec les pleurodèles ayant séjourné à bord de Mir, puisque l'équivalent des IgA sécrétoires (les IgY) du pleurodèle sont augmentées suite à ce séjour (Boxio *et al.*, 2005). Enfin, les IgG plasmatiques sont augmentés surtout chez les souris 2G, moins chez les souris 3G. Ces résultats montrent que les plasmocytes produisant les différents isotypes d'anticorps ont une sensibilité différente à la gravité.

3. Conclusion

Nos résultats montrent qu'une augmentation de la gravité provoque une réaction au stress au-delà de 2G. En effet, aucune réponse physiologique ou comportementale n'existe à 2G, mais au-delà, on constate une nette réponse au stress ainsi que de l'anxiété. Cependant, nous constatons des changements au niveau du système immunitaire dès 2G. Cela indique clairement qu'une modification de la gravité, associée ou non à une réponse au stress, est responsable de modifications du système immunitaire.

PUBLICATION 5

Psychoneuroendocrinology, 2012

Psychoneuroendocrinology (2012) 37, 137—147

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/psyneuen



Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice

Nathan Guéguinou [a], Mickaël Bojados [b], Marc Jamon [b], Hanane Derradji [c], Sarah Baatout [c,d], Eric Tschirhart [e], Jean-Pol Frippiat [a], Christine Legrand-Frossi [a,*]

[a] *Nancy-University, Henri Poincaré University, Development and Immunogenetics team, JE 2537, 9 Avenue de la forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[b] *INSERM UMR-910, Functional Genomics, Pathology and Behavior, Faculty of Medicine of La Timone, F-13010 Marseille, France*
[c] *Molecular & Cellular Biology, Institute for Environment, Health & Safety, SCK.CEN, Boeretang 200, B-2400 Mol, Belgium*
[d] *Faculty of Bioengineering Sciences, Gent University, Coupure Links, B-9000 Gent, Belgium*
[e] *Université du Luxembourg, Campus Limpertsberg, Faculté des Sciences, Techniques et de la Communication, Life Sciences Research Unit — Inflammation, 162a, avenue de la Faïencerie L-1511 Luxembourg, Luxembourg*

Received 28 January 2011; received in revised form 12 May 2011; accepted 28 May 2011

KEYWORDS
Mice;
Hypergravity;
Anxiety Behavior;
Stress;
Corticosterone;
Immunoglobulins;
Humoral immunity;
Cytokines

Abstract Spaceflights are known to induce stress and immune dysregulation. Centrifugation, as hindlimb unloading, is a good ground based-model to simulate altered gravity which occurs during space missions. The aim of this study was to investigate the consequences of a long-term exposure to different levels of hypergravity on the stress response and the humoral immunity in a mouse model. For this purpose, adult C57Bl/6J male mice were subjected for 21 days either to control conditions or to 2G or 3G acceleration gravity forces. Corticosterone level and anxiety behavior revealed a stress response which was associated with a decrease of body weight, after 21-day of centrifugation at 3G but not at 2G. Spleen lymphocyte lipopolysaccharide (LPS) responsiveness was diminished by 40% in the 2G group only, whereas a decrease was noted when cells were stimulated with concanavalin A for both 2G and 3G groups (about 25% and 20%, respectively) compared to controls. Pro-inflammatory chemokines (MCP-1 and IP-10) and Th1 cytokines (IFNγ and IL2) were slightly decreased in the 2G group and strongly decreased in the 3G mouse group. Regarding Th2 cytokines (IL4, IL5) no further significant modification was observed, whereas the immunosuppressive cytokine IL10 was slightly increased in the 3G mice. Finally, serum IgG concentration was twice higher whereas IgA concentration was slightly increased (about 30%) and IgM were unchanged in 2G mice compared to controls. No difference was observed in the 3G group with these isotypes. Consequently, functional immune dysregulations and stress responses were dependent of the gravity level.
© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: 9 avenue de la forêt de Haye, Bâtiment AB, 2è étage, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 03 83 68 37 25; fax: +33 03 83 68 37 22.
E-mail address: christine.legrand-frossi@scbiol.uhp-nancy.fr (C. Legrand-Frossi).

0306-4530/$ — see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.psyneuen.2011.05.015

1. Introduction

Organisms react to acute or chronic environmental variations by activating a complex repertoire of physiologic central nervous system and peripheral adaptive responses. This results in the activation of the stress system: first the efferent sympathetic nervous system (SNS) then the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (Elenkov and Chrousos, 2006). Excessive and/or prolonged stress responses may affect in the long-term behavioral and/or physiological functions such as growth, metabolism, circulation, reproduction and the immune response (Johnson et al., 1992). The principal stress hormones, catecholamines and glucocorticoids, resulting in SNS and HPA axis activation respectively, affect major immune functions such as leukocyte traffic and proliferation, secretion of cytokines and antibodies, and selection of the T helper 1 (Th1) *versus* T helper 2 (Th2) responses, (Elenkov and Chrousos, 1999). Furthermore, stress can occur in a variety of forms, physical or psychological, acute or chronic, inducing various hormonal, physiological and immune alterations (Webster-Marketon and Glaser, 2008).

Spaceflight is a unique multifactorial stress model, inducing psychosocial and physical stresses such as high G forces at launch and landing, radiations, circadian rhythm perturbation, microgravity and nutritional perturbations (Macho et al., 1996; Sonnenfeld et al., 2003). This multitude of factors has profound immunosuppressive effects that could lead to compromised defences against infections and tumours. Given the prime role of antibodies to protect the organism to fight pathogenic microorganisms, whose virulence has been shown to be increased in the space environment (Nickerson et al., 2000; Wilson et al., 2002, 2007), it is very important to determine which mechanisms are involved in potential humoral immunity changes during long-term spaceflights.

Over the past three decades there have been a large number of investigations to understand the effects of spaceflight on the immune system (Guéguinou et al., 2009). However, by comparison with natural immunity and T cell responses, our knowledge of spaceflight-induced alterations of the humoral immune system is less developed. Measures of Ig concentrations in the serum did not reveal significant changes during short-term spaceflight (Voss, 1984) while long-term spaceflight showed more contrasted results. Sonnenfeld et al. (1998), Stowe et al. (1999) and Rykova et al. (2006) did not report any humoral change, but Konstantinova et al. (1993) observed an increase of IgA and IgM in cosmonaut serum. The unique immunization of animal during spaceflight have been realized on amphibian model (*Pleurodeles waltl*) which showed a modification in VH genes utilization to build IgM heavy chain and a decrease in somatic hypermutations (Boxio et al., 2005; Bascove et al., 2009).

Due to the cost and limited availability of spaceflight missions, various ground-based models have been developed. Among them, gravity change is widely studied, either by reducing the gravity constraints by means of head down tilt bed rest for humans (Uchakin et al., 1998; Schmitt et al., 2000; Shearer et al., 2009), antiorthostatic tail suspension in rodents (Sonnenfeld et al., 1982; Felix et al., 2004; Morey-Holton et al., 2005) or by increasing the gravity level through chronic centrifugation (Goldstein and Ishay, 1998; Grigorenko et al., 2003; Pecaut et al., 2004). Even though they act mechanically in a opposite way, these altered gravity model simulate many of the chronic stressors inherent to spaceflight experiments *i.e.*: exposure to a novel environment, changes in limbs loads, cephalic fluid distribution shifts, and orthostatic intolerance (Cogoli, 1993). Most studies focused on the hindlimb unloading model and its consequences on stress response and on the immune system (Caren et al., 1980; Kopydlowski et al., 1992; Miller et al., 1999; O'Donnell et al., 2009). The few experiments of chronic centrifugation of rats showed a high activation of the SNS and HPA axis systems. The SNS system was activated only from 4G hypergravity (Petrak et al., 2008), whereas an increase in circulating corticosterone was observed at the beginning of the centrifugation at 3G (Yuwaki and Okuno, 2004). Moreover, several authors (Santucci et al., 2000; Bouët et al., 2004) have demonstrated that hypergravity chronic exposure may affect emotional/anxiety responses as well as spatial learning, but some of these behavioral changes are often reversible after return to normal gravity (Bouët et al., 2003). The main immunological study conducted by Pecaut et al. (2004) on mice centrifuged at 2G or 3G during 21 days has quantified changes in spontaneous and mitogen-induced lymphoproliferation and the *in vitro* capacity of splenocytes to secrete cytokines. Unfortunately they measured neither antibodies nor corticosterone nor anxiety level.

In an effort to better characterize the effect of changing the gravitational environment on the HPA axis system and the humoral immunity, we investigated the effects of a long-term exposure to various levels of hypergravity in the most widely used inbred mouse strain (C57Bl/6J). For this purpose, mice were centrifuged at 2G or 3G during 21 days. The first aim of the present investigation was to clarify whether each of the G levels resulted in a stress response via HPA axis activation. Thus, the thymus and spleen masses and serum corticosterone concentration were quantified immediately after stopping the centrifuge. The second aim was to determine if emotional/anxiety responses previously observed after hypergravity chronic exposure were reversible after return to normogravity. The level of anxiety was evaluated by behavioral tests, L/D box and elevated plus-maze tests, 15 days after the return to normogravity. The third aim was to explore the consequences of mitogen-induced proliferation of splenic B and T cells, on circulating antibodies and *in vivo* cytokines involved in Th activation and cell traffic.

2. Methods

2.1. Animals

The experiment was conducted on male mice to avoid oestrus cycle interaction with stress components known in female behavior. Eight week old C57BL/6J male mice of a mean body mass of 20 g were purchased from Charles River (France). They were housed by groups of four mice in standard cages (36 cm × 20 cm × 14 cm), with food and water *ad libitum*, in a quiet room with constant temperature (22 °C), 50% relative humidity, and a 12 h light, 12 h-dark cycle (dark period 2000 h–0800 h) during a week for acclimation to room conditions. All experimental procedures were carried out in conformity with the European Community Council directive

of November 24, 1986, and were approved by our local ethical committee (''Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale de la Région Provence'').

2.2. Centrifugation

Cages were placed in a large radius centrifuge (Jamon and Serradj, 2008) with a rotational speed producing a gravity vector of 2G or 3G. Mice were supplied enough food and water for three weeks, so that the centrifuge was operating continuously. Mice were left undisturbed during the three weeks of chronic centrifugation. An infra-red videos fixed on the centrifuge arms allowed a remote day and night control of the mice in their cages. All the environmental variables, except the gravity level, were the same as in standard housing. The cages containing control mice were placed in similar gondolas and in the same room than the centrifuged mice, but in a static position. At the end of the 21 days of centrifugation, the experimental groups of mice (control, 2G and 3G) were randomly divided into animals sacrificed immediately for biological sample collection ($n = 12$ for each experimental group) and animals used for behavioral studies 15 days later ($n = 12$ for each experimental group).

2.3. Behavioral tests

At the end of the centrifugation period, mice were returned back to the standard housing conditions for 15 days. The groups of four mice that were submitted to the centrifugation challenge were kept unchanged in those standard conditions. The 15 days delay was determined to avoid any stress and other behavioral impairments related to the readaptation to normogravity, that could biase the anxiety-related test responses. The level of anxiety was assessed using two apparatus: the Light/Dark box (L/D box) and the elevated plus-maze (EPM). The L/D box consists of a light chamber (25 cm $\times$ 25 cm $\times$ 25 cm) made of white Perspex, brightly illuminated (500 lux), and connected by a 7 $\times$ 7 cm aperture to a dark chamber (25 cm $\times$ 17 cm $\times$ 25 cm) made of black Perspex (15 lux) (Bioseb, France). Each mouse was placed in the centre of the dark area and observed for 600 s. The delay to the first entry in the light area, the total time spent in the light area and the number of transitions between the light and dark compartments were recorded. The Elevated Plus-Maze (EPM) (MedAssociates Inc. St. Albans, USA) consists of a plus-shaped maze with two arms closed by side walls and two open arms. The mouse was placed in the centre, facing an open arm, and was allowed to explore the whole apparatus for 600 s. Mouse activity was recorded with a system of video analysis of movements (Ethovision 2.3, Noldus, ltd, Wageningen, NL). The anxiety level was then evaluated by comparing the relative time spent in the open arms and the relative time spent in the closed arms. In addition, the overal level of activity in the EPM was assessed by recording the total moving time and the frequency of moving bouts, to account for an eventual influence of the motor activity on the stress indices.

2.4. Sample collection

Mice were weighed (Mettler PE 4000, France) then decapitated and the trunk blood was collected and allowed to clot at ambient temperature for 15 min. Serum was collected by centrifuging at 4 °C (15 min at 2000 $\times$ *g*) and stored at −80 °C until sample analysis. Blood was collected between 0900 h and 1100 h for corticosterone, cytokine and immunoglobulin measurements. The spleen and thymus of each animal were weighed (Mettler Toledo, AB104-S, France). Then, the spleen was used to perform lymphocyte proliferation assays and placed into sterile plastic tubes containing 5 mL of RPMI 1640 medium (Sigma–Aldrich, USA) supplemented with 25 mM Hepes, 2 mM L-glutamine and 10% of fetal calf serum (Sigma–Aldrich, USA).

2.5. Corticosterone assay

To assess the adrenal response after the 21 days of centrifugation, the corticosterone concentration was measured without any extraction procedure, using a commercial ELISA kit and according to the manufacturer's guidelines (Assay Design Inc., USA). The concentration of corticosterone in serum samples was calculated from a standard curve and expressed in ng/mL. The intra- and inter-assay coefficients of variation were under 8.4% and 13.1%, respectively.

2.6. Lymphoproliferation measurements

Three mitogens, concanavalin A (ConA, Sigma–Aldrich, USA) and lipopolysaccharide (LPS) originating from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* (Sigma–Aldrich, USA) were used to assess lymphocyte responsiveness in the spleen. The spleen was disaggregated into a RPMI 1640 tissue culture medium enriched with 25 mM Hepes, 2 mM L-glutamine and 10% fetal calf serum. Lymphocyte counts were determined with a haemocytometer and the suspension was adjusted to a working concentration of 50×10^4 cells/mL. 50 μL of splenocyte suspension were distributed in triplicates into the wells of a 96-wells flat-bottom tissue culture plate containing 50 μL of medium or mitogens (ConA or LPS from *E. coli* or *S. enterica*) at a final concentration of 4 μg/mL, 5 μg/mL and 20 μg/mL, respectively. The cells were incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO_2. Then, 20 μL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, tetrazolium compound, Promega Corporation, USA) were added in each well to determinate the number of viable cells. After incubation during 4 h at 37 °C and 5% CO_2, optical density (OD) was measured at 490 nm using a 96-well plate reader (BioRad, USA). An index of proliferation (IP) was then calculated as follow: IP = OD (490 nm) of stimulated cells/OD (490 nm) of unstimulated cells.

2.7. Cytokine assay

To quantify serum cytokines, we used the commercial kit ''Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Panel'' (Millipore life sciences, USA) using the Luminex™ technology according to the manufacturer's instructions. Seven cytokines were simultaneously quantified: monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interferon γ-induced protein-10 (IP-10), interferon γ (INFγ) and four interleukines (IL2, IL4, IL5 and IL10).

2.8. Immunoglobulin assays

The concentrations of serum immunoglobulins (IgM, IgG and IgA) were determined using commercial ELISA kits according to the manufacturer's guidelines (Bethyl laboratories Inc., USA). The concentration of immunoglobulins in serum samples was calculated from a standard curve and expressed in mg/mL.

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS v13.0 (SPSS Inc, USA). Outlier values were determined by boxplot of each group studied. When normality and homogeneity of variances were respected as determined by Kolmogorov–Smirnov and Levene tests, ANOVA were performed and Tuckey *post-hoc* tests were used to establish inter-group comparisons (controls, 2G, 3G). When data were not normally distributed, Kruskal–Wallis non parametric tests were performed and Dunnett T3 *post-hoc* tests were used for inter-group comparisons. p-Values <0.05 and <0.10 were selected to indicate significance and trend, respectively. All results are shown as means $\pm$ standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. Body mass gain

Table 1 shows that a significant difference in the gain of body mass between the three experimental groups after 21 days of centrifugation ($F_{2,33} = 14.254$, $p < 0.001$). Post-hoc test indicates that the rate of mass gain was for 2G mice and control mice ($p = 0.754$), but a significant difference in the body mass gain appeared when mice are centrifuged at 3G (*versus* control: $p < 0.001$; *versus* 2G: $p = 0.001$). These 3G mice experienced a significant mass loss over 21 days of 0.18 g while the other mice grew by about 10%.

3.2. Lymphoid organ normalized mass

Organ masses were normalized to the body mass at the end of centrifugation (Table 1). No significant difference appeared between normalized spleen mass of control group and both hypergravity groups ($F_{2,33} = 1.912$, $p = 0.165$). On the other hand, a tendency was observed for normalized thymus mass ($F_{2,33} = 2.571$, $p = 0.092$). Even though hypergravity mice were similar to control mice (control *versus* 2G: $p = 0.744$; control *versus* 3G: $p = 0.330$), there was a decrease of 20% observed for 3G mice compared to 2G mice ($p = 0.081$).

Table 1 Body mass gain and lymphoid organ normalized mass after 21 days of hypergravity. The normalized mass was calculated with the ratio [organ mass/body mass] for each mouse. Control group was compared to 2G or 3G centrifuged mice. $n = 12$ mice per group for body mass and for both lymphoid organs. Differences were found to be statistically significant using ANOVA and Tuckey *post-hoc* test.

Group	Body mass gain (g)	Normalized spleen mass (mg/g)	Normalized thymus mass (mg/g)
Control	$+1.93 \pm 0.258$	3.10 ± 0.202	1.50 ± 0.096
2G	$+1.62 \pm 0.253$	2.69 ± 0.111	1.60 ± 0.093
3G	$-0.18 \pm 0.411^{*,\#}$	2.85 ± 0.136	$1.29 \pm 0.122^{\dagger}$

* $p < 0.05$ *versus* control.
$^{\#}$ $p < 0.05$ *versus* 2G.
† $0.05 < p < 0.10$ *versus* 2G.

3.3. Corticosterone

As shown in Fig. 1, serum corticosterone concentrations were different between the three experimental groups ($F_{2,33} = 17.375$, $p < 0.001$). Post-hoc analyses showed no significant difference between control and 2G group ($p = 0.945$), while corticosterone concentration was doubled in 3G mice when compared to either control ($p = 0.002$) or 2G mice ($p = 0.001$).

3.4. Anxiety-related behaviors

Considering the L/D box, 3G mice showed a greater latency to enter the light area compared to control and 2G mice ($H = 11.653$, degrees of freedom (df) = 2, $p = 0.003$, Fig. 2A). The latency of first entry in the light area of 3G mice was indeed increased by a factor greater than 3 compared to control mice (Fig. 2A). The number of transitions between the light and dark areas was not significantly different between groups ($F_{2,32} = 2.832$, $p = 0.074$, Fig. 2B), although 3G mice did less transitions than the 2G and control groups. Moreover, the time spent in the light area by both 2G and 3G mice was significantly smaller that of control mice ($F_{2,32} = 7.551$, $p = 0.002$, Fig. 2C). The total distance travelled in the EPM during the test was not significantly different between control, 2G and 3G groups ($F_{2,33} = 0.770$, $p = 0.471$, data not shown). The number of movements achieved by mice during the test was however significantly greater with 3G mice than with 2G mice ($F_{2,33} = 4.590$, $p = 0.018$; 45.9 ± 5.6, 38.1 ± 2.1, 59.8 ± 5.6, respectively for control, 2G and 3G mice, data not shown). By contrast, the total duration of movements done by the mice were significantly smaller in 3G mice than with both 2G and control

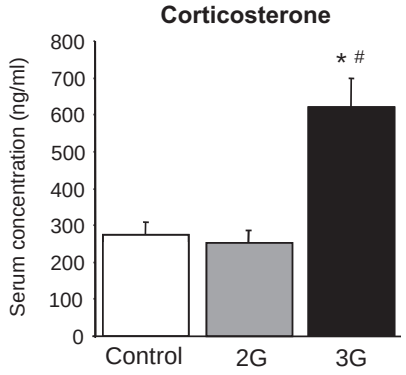


Fig. 1 Serum corticosterone concentration after 21 days of hypergravity. Control group was compared to 2G or 3G centrifugated mice. $n = 12$ mice per group. Differences were found to be statistically significant using ANOVA and Tuckey *post-hoc* test. $^{*}p < 0.05$ *versus* control; $^{\#}0.05 < p < 0.01$ *versus* 2G.

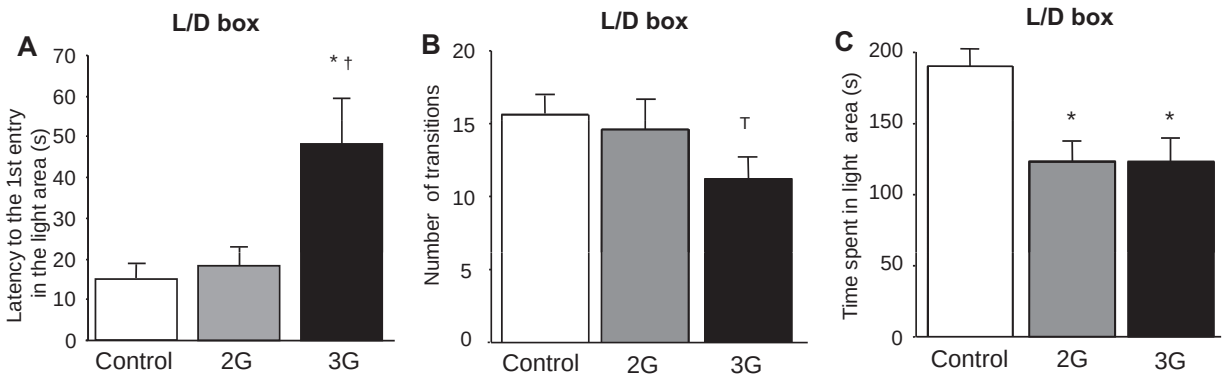


Fig. 2 Mouse behavior in L/D box. (A) Latency to the 1st entry in the light area (s). (B) Number of transitions between dark and light area. (C) Time spent in the light area (s). Control group was compared to 2G or 3G centrifugated mice. n = 12, 11 and 12 for control, 2G and 3G, respectively. Differences were found to be statistically significant using Kruskal—Wallis and Dunnett T3 *post-hoc* test (A) or ANOVA and Tuckey (B and C) *post-hoc* test. $^{*}p < 0.05$ *versus* control; *T*: $0.05 < p < 0.10$ *versus* control; $^{\dagger}0.05 < p < 0.10$ *versus* 2G.

mice ($F_{2,33} = 8.906$, $p = 0.001$, Fig. 3A). Time spent in the open arms was different between groups ($H = 7.005$, $df = 2$, $p = 0.030$): 3G mice spent less time exploring the open arms than the other groups, though no post-hoc significant differences were noticed (*versus* control $p = 0.164$; *versus* 2G $p = 0.070$). In addition, the time spent in the closed arms and the time spent exploring the EPM centre were significantly different between the three experimental groups ($F_{2,33} = 7.799$, $p = 0.002$ for closed arms and $F_{2,33} = 10.144$, $p < 0.001$ for centre, Fig. 3B). 3G mice explored these compartments less than both control and 2G mice (for closed arm: $p = 0.014$ and $p = 0.002$, respectively; for centre: $p = 0.005$ and $p = 0.001$, respectively) indicating therefore a more anxious behavior.

3.5. Lymphoproliferation

The ConA-induced proliferation response of splenocytes (Fig. 4A) decreased after 21 days of centrifugation ($F_{2,31} = 25.714$, $p < 0.001$). Post-hoc analyses showed a significant diminution of lymphoproliferative response for 2G and 3G mice compared to control ($p < 0.001$). The proliferation response tended to decrease even more in 2G group than in 3G group (2G *versus* 3G: $p = 0.061$). The *E. coli* LPS-induced proliferation response of splenocytes was significantly different within the three experimental groups (Fig. 4B, $F_{2,31} = 20.505$, $p < 0.001$). 2G centrifuged mice showed a decrease of about 40%, compared to control and 3G mice ($p = 0.001$, Tuckey *post-hoc* test), whereas 3G centrifuged mice did not differ from control ($p = 0.894$). Similar results were obtained with *S. enterica* LPS-induced proliferation response of splenocytes (data not shown).

3.6. Cytokines

Given the amount of serum necessary for cytokine assays, the number of samples that was assayed was less than for the corticosterone and immunoglobulin measurements, and so the statistical analysis was performed using the Kruskal—Wallis and Dunnett T3 *post-hoc* tests. MCP-1 serum concentration was significantly different between control and hypergravity mice ($H = 9.721$, $df = 2$, $p = 0.008$). Although a decrease of MCP-1 concentration was observed in 2G mice serum beside control mice, this difference was not significant ($p = 0.228$) and the eight time lower concentration in 3G group than in control group was only detected as a trend

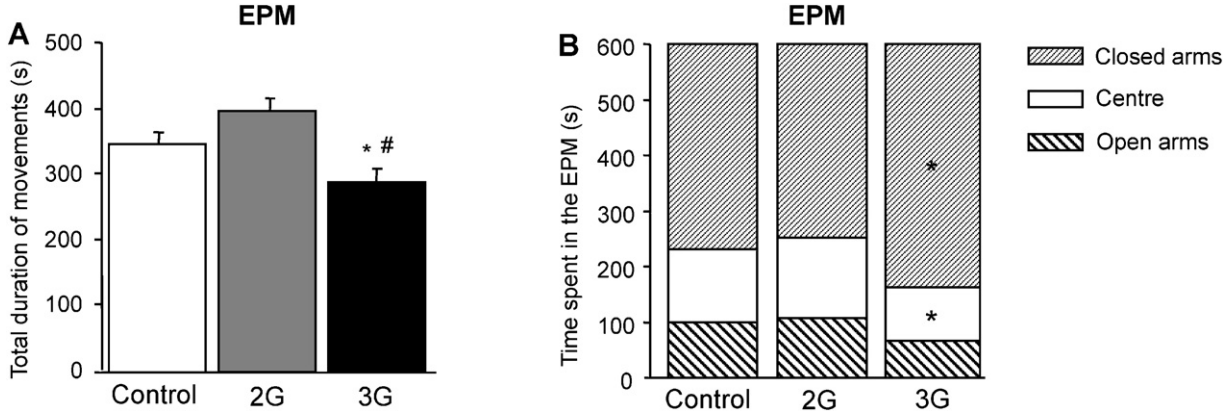


Fig. 3 Mouse behavior in EPM. (A) Total duration of movements (s). (B) Time spent in the EPM (s). Control group was compared to 2G or 3G centrifugated mice. n = 12 for each experimental groups. Differences were found to be statistically significant using ANOVA and Tuckey *post-hoc* test. $^{*}p < 0.05$ *versus* control; $^{\#}0.05 < p < 0.01$ *versus* 2G.

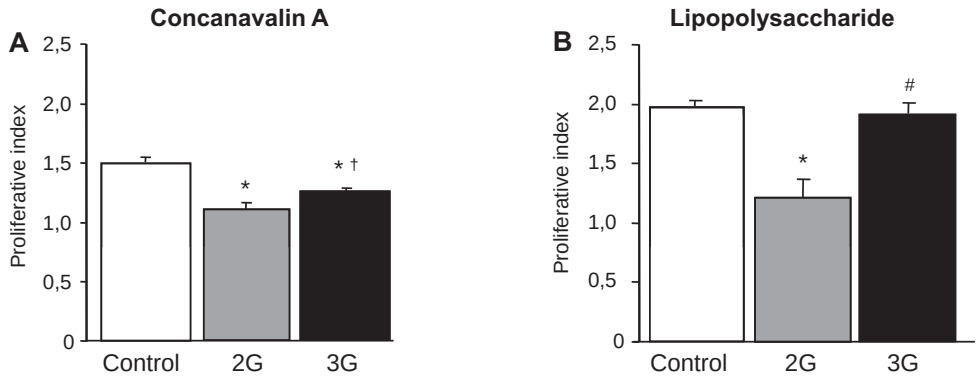


Fig. 4 Proliferative index (PI) of splenocytes after 48 h of culture with the mitogens. (A) *Canavalia ensiformis* Concanavalin A (ConA). (B) *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). Control group was compared to 2G or 3G centrifugated mice. n = 12, 10 and 12 for control, 2G and 3G, respectively. Differences were found to be statistically significant using ANOVA and Tuckey *post-hoc* test (A) or Kruskal—Wallis and Dunnett T3 *post-hoc* test (B). $^{*}p < 0.05$ *versus* control; $^{\#}p < 0.05$ *versus* 2G; $^{\dagger}0.05 < p < 0.10$ *versus* 2G.

($p = 0.082$). This can be explained by inter-individual variability in the control group. On the other hand a significant decrease was shown between 2G and 3G groups ($p = 0.030$) (Fig. 5A). IP-10 serum concentration was significantly different between the three groups of mice ($H = 6.930$, $df = 2$, $p = 0.031$). Fig. 5B shows that the diminution was greater as the gravity level increases, but the *post hoc* test revealed only a slight decrease for the 3G group compared to controls ($p = 0.083$) while no significant difference was observed between 2G and both control and 3G mice ($p = 0.281$ and $p = 0.724$, respectively) for circulating IP-10. Fig. 5C shows that IFNγ serum concentration was significantly different between the three groups ($H = 8.825$, $df = 2$, $p = 0.012$). IFNγ quantified in 2G mice serum did not differ neither from control nor from 3G mice serum ($p = 0.710$ and 0.157, respectively). In 3G mice serum, the IFNγ amount decreased by about 7 fold from control ($p = 0.005$). Fig. 5D shows that the diminution of IL2 concentration was greater as the gravity level increases ($H = 10.163$, $df = 2$, $p = 0.006$). IL2 was significantly reduced in 2G and 3G sera beside control ($p = 0.033$ and $p = 0.002$, respectively), whereas no significant difference appears between 2G and 3G mice ($p = 0.162$). Finally, IL4, IL5, and IL10 quantification showed no significant difference between the three experimental groups ($H = 0.763$, $df = 2$, $p = 0.763$; $H = 1.137$, $df = 2$, $p = 0.566$; $H = 2.310$, $df = 2$, $p = 0.315$, respectively Fig. 5E—G). It is noteworthy to mention that IL10 was two fold higher in the 3G group in comparison with the control group.

3.7. Serum immunoglobulins

Fig. 6A shows that no difference was obtained for serum IgM isotype concentration between the three experimental groups ($H = 0.376$, $df = 2$, $p = 0.829$). A great difference was detected for the IgG isotype between the three groups ($H = 17.788$, $df = 2$, $p < 0.001$). The level was two fold increased for mice centrifuged at 2G compared to controls ($p < 0.001$), whereas a lower increase was obtained in serum from 3G mice compared to controls ($p = 0.069$, Fig. 6B). Moreover, IgG concentration of 2G mice was significantly higher than concentration of 3G mice ($p < 0.001$). Finally, serum IgA concentrations of hypergravity mice were significantly different from control mice ($F_{2,31} = 4.318$, $p = 0.022$), although these differences were lower than those observed with the IgG isotype (Fig. 6C). IgA concentration were slightly raised in 2G and 3G mice compared to control mice ($p = 0.082$ for both comparisons) and no difference appeared between 2G and 3G mice for this isotype ($p = 0.840$).

4. Discussion

Our results show that mice did not gain body mass when they were exposed to 3G during 21 days, whereas they gained body mass at 2G similarly to control mice. It was currently accepted that the exposition to increased gravity impaired the body mass (Wade and Gerald, 2005). The loss of body mass was commonly agreed to be caused by an initial and transient hypophagia in centrifugated mice (Moran et al., 2001; Yuwaki and Okuno, 2003; Kita et al., 2006; Ishizawa et al., 2009). Indeed, Ishizawa et al. (2009) have observed starvation-dependent and independent effects on centrifugated mice. This mass loss was due to a body fat reduction during the first days of the centrifugation which was triggered by a disruption of the homeostasis mediated by a vestibulo-hypothalamic pathway (Fuller et al., 2002). Moreover, Kita et al. (2006) have shown that exposure to hypergravity impairs body mass in a dose-dependent manner with a threshold possibly existing between 1.5 and 2.5G. Our results are in accordance with these studies since 1G and 2G mice weighed the same amount at the end of the experiment, unlike the 3G mice which have not gained body mass. Our findings concerning normalized spleen and thymus masses showed a slight reduction of the normalized thymus mass obtained for 3G compared to 2G centrifuged mice. In previous reports, the effects of gravity alteration on lymphoid organs mass has been reported to be variable (Chapes et al., 1999; Erofeeva et al., 2003; Baqai et al., 2009), which could be explained by the variability of experimental conditions: spaceflight profile, ground-based model, duration and animal model studied. Despite these limitations, spleen and thymus mass reductions, when observed, are often explained by a combination of stress response and body fluid shift due to the

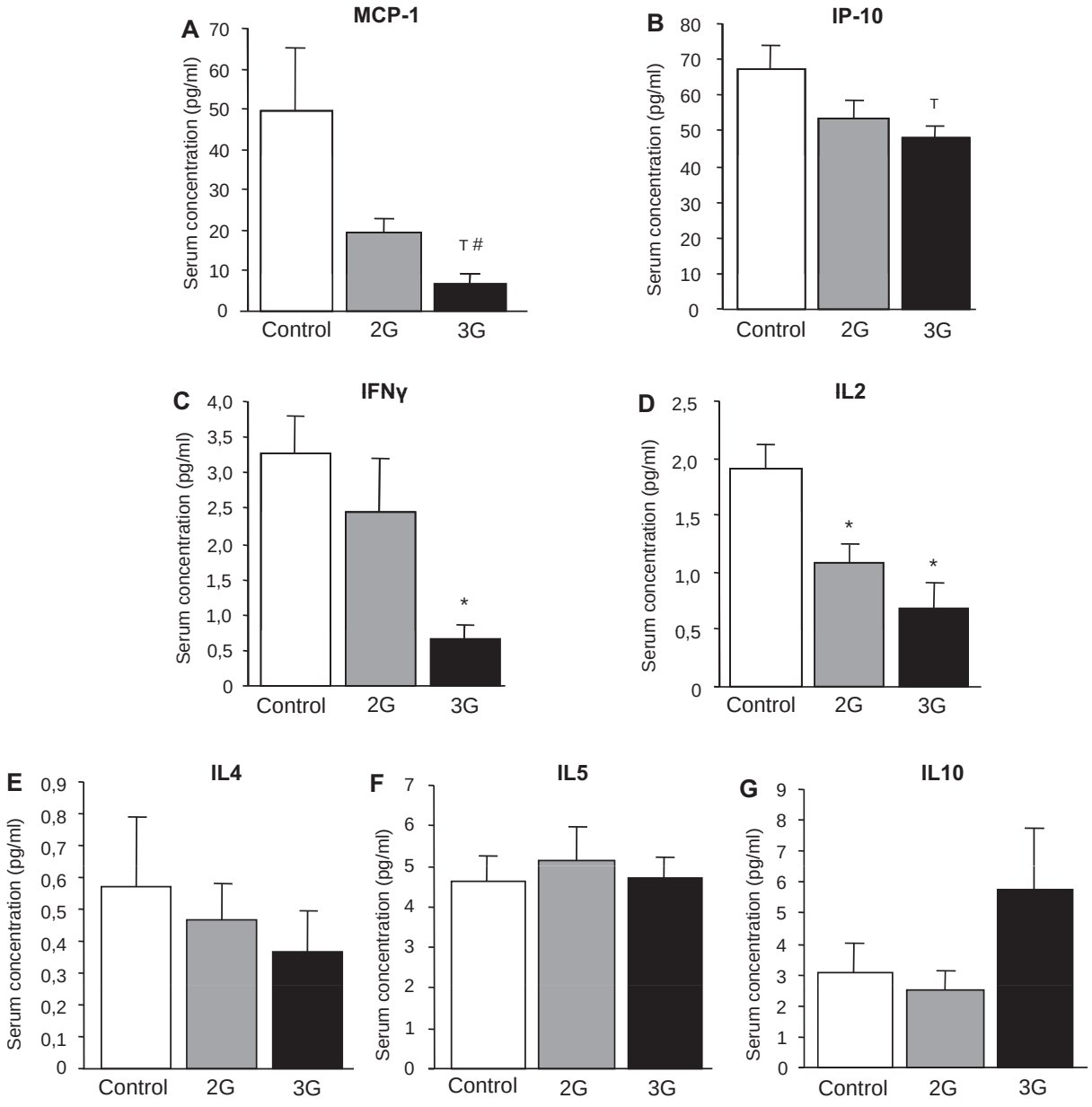


Fig. 5 Serum cytokine concentration after 21 days of hypergravity. (A) MCP-1, (B) IP-10, (C) IFNγ, (D) IL2, (E) IL4, (F) IL5 and (G) IL10. Control group was compared to 2G or 3G centrifugated mice. $n = 7$, 5 and 6 mice for control, 2G and 3G, respectively. Differences were found to be statistically significant using Kruskal–Wallis and Dunnett's T3 *post-hoc* test. $^{*}p < 0.05$ *versus* control; *T*: $0.05 < p < 0.10$ *versus* control; $^{\#}p < 0.05$ *versus* 2G.

altered gravity (Sonnenfeld et al., 1992; Aviles et al., 2005). So it seems particularly important to discriminate between the effects due to stress and those due to the shift of body fluids. After three weeks of centrifugation serum corticosterone concentration was not different in both control and 2G groups. Ortiz et al. (1999) have reported a transient elevation of plasma GC observed in rats centrifuged at 2G. Although interspecies comparison is limited by scaling effects, we can rationally speculate that 2G was sufficient to induce HPA axis activation at the beginning of the centrifugation. By day 21, 3G group presented a twice higher serum corticosterone concentration than both control and 2G groups. Moreover, mice exposed to 4G presented a 4-fold increase in corticosterone compared to control or 2G group (data not shown). Our results are in accordance with Yuwaki and Okuno (2004) who have also reported a high production of GC in mice centrifuged at 3G. These studies allow us to confirm that hypergravity is a stressful environment and is time- and dose-dependent, with a threshold below 3G for our mouse model as Petrak et al. (2008) have proposed for rats.

Chronic stress induces long-term neuroendocrinal and behavioral effects, including increased anxiety in relation with the alteration of HPA axis (review in Armario et al., 2008). The measure of anxiety-like behaviors consecutive to the exposition to hypergravity has been rarely investigated. Previous studies on adult (Francia et al., 2006) and adolescent CD-1 mice (Francia et al., 2004) centrifuged at 2G for 1 or 2 h, and tested 24 h later in the EPM, did not show clear-

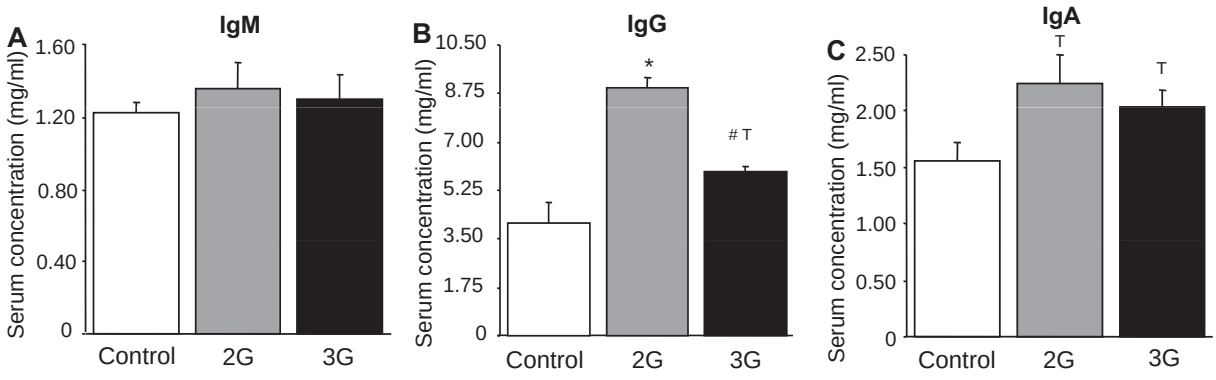


Fig. 6 Serum immunoglobulin concentration after 21 days of hypergravity. (A) IgM, (B) IgG and (C) IgA. Control group was compared to 2G or 3G centrifugated mice. $n = 12$, 10 and 12 mice for control, 2G and 3G, respectively. Differences were found to be statistically significant using Kruskal—Wallis and Dunnett's T3 *post-hoc* test (A and B) or ANOVA and Tuckey *post-hoc* test (C). $^{*}p < 0.05$ *versus* control; *T*: $0.05 < p < 0.10$ *versus* control; $^{\#}p < 0.05$ *versus* 2G.

cut results because of their reduced spontaneous activity after centrifugation. But these observations supported the hypothesis that hypergravity acts as a stimulus selectively affecting the emotional-like profile. Further studies showed that the changes produced by this short exposition at 2G persisted 20 days later suggesting a durable elevated level of anxiety-like behaviors in these animals (Santucci et al., 2009). To determine how long the stress response prolonged, we performed anxiety analyses on centrifuged and control mice 15 days after returning to normogravity. Unfortunately, it was impossible to draw blood on this batch of mice in order to avoid any stress and other behavioral impairments. Mice subjected to a chronic centrifugation at 2G did not show long-term change in the anxiety-like behaviors, but a strong increase was observed in 3G mice. These anxiety-like responses of 3G centrifuged mice could be linked to vestibular dysfunction. This hypothesis is supported by numerous observations which reported correlations between vestibular dysfunction and stress and anxiety (Perna et al., 2001; Balaban and Thayer, 2001; Gliddon et al., 2003). Our results show for the first time the dose- and time-dependent effect of chronic hypergravity on long-term anxiety. The changes in body mass, serum corticosterone concentration and behaviors suggest that after three weeks of exposure to hypergravity the 2G mice have adapted to their new environment, in opposition to 3G mice.

To determine the consequences of hypergravity exposure on the proliferative capacity of splenic B and T cells, we measured their mitogen response. Significant depression of T cell response to ConA and a strong decrease of B cell response to LPS for 2G mice were obtained compared to control. For 3G mice the response to ConA was less depressed than for 2G and the response to LPS was similar to control. The decrease of mitogen-induced T cell proliferation obtained with the 3G group could be due to prolonged stress response because numerous studies showed that the suppression of T lymphocyte mitogen reactivity was often associated with an increase in blood corticosteroid (Kimzey et al., 1976; Cogoli and Cogoli-Greuter, 1997). Furthermore, decreases in the mitogen response of T cell were consistently reported in altered gravity (Lesnyak et al., 1993). A kinetic study, involving the daily stop and start the centrifuge, dealing with the effect of hypergravity on the mouse immune system led by Pecaut et al. (2004) showed splenocyte response to ConA and LPS depending on the duration of centrifugation but not on the level of gravity. In contrast, our results bring out gravity level-dependent effects, since the inhibitory effects on lymphoproliferation were greater than 2G to 3G. For the 2G group, in which no increase of corticosterone was detected at the end of centrifugation, the altered B and T cell response could be explained by a fluid shift which affected lymphocyte migration. Numerous studies have shown that altered gravity resulted in lymphocyte subpopulation redistribution consistent with changes in the expression of adhesion molecules (Sonnenfeld et al., 1992; Cooper and Pellis, 1998; Pecaut et al., 2003). Furthermore, changes in the spleen were most significative (Grove et al., 1995), with an overall shift in lymphocytes away from T cells toward B cells after a space mission (Pecaut et al., 2003). Consequently, further research is necessary to investigate the population of spleen cells affected by 2G and 3G conditions by flow cytometry. The quantification of two circulating chemokines, involved in the traffic of monocytes and memory T cells, MCP-1 and IP-10, already gives us some indications. A strong significant decrease of MCP-1 concentration was observed for 3G mice, while a lower decrease was measured for 2G mice. This great decrease is probably due to the production of corticosterone which is a strong inhibitor of MCP-1 production (Mukaida et al., 1991) and a suppressor of the migration of inflammatory cells (Mizobe et al., 1997). Our data show clearly and for the first time to our knowledge, that altered gravity has an impact on the secretion of this chemokine in the blood. Even if it was not statistically significant, the concentration of IP-10 was slightly decreased when the level of gravity was increased. IP-10 is a proinflammatory chemokine known to promote the production of Th1 cytokines and suppressing the Th2 response (Romagnani et al., 2005). Recent work has suggested that IP-10 is down-regulated in spleen consecutive to stress (Curtin and Carroll, 2009). Moreover, gene expression analyses have demonstrated that spaceflight induces significant changes in the thymic mRNA expression of genes that regulate stress, glucocorticoid receptor metabolism, and T cell signaling activity, especially IP-10 (Lebsack et al., 2010). All these observations led us to conclude that the synthesis of MCP-1 and IP-10 are sensitive to altered gravity.

Given these results about IP-10 expression, we quantified Th cytokines. Our experiments showed that IFNγ and IL2 are significantly decreased in the 3G group, while only IL2 was decreased in the 2G group. The decrease of IFNγ and IL2, two typical Th1 cytokines, are currently described after exposure to altered gravity, either in serum (Konstantinova et al., 1993; Sonnenfeld et al., 1996) or in lymphocyte culture supernatant (Gould et al., 1987; Gmünder et al., 1990; Lesnyak et al., 1996; Pecaut et al., 2004; Gridley et al., 2009). Our data, combined to the others, clearly indicate that Th1 lymphocytes are impacted, in a dose-dependent manner by hypergravity. This low capacity to produce IL2 and IFNγ in the 3G group associated with reduced T cell mitogen response could compromise immune defences against infectious agents like viruses and intracellular pathogens. Our results do not show an increase of Th2 cytokines (IL4 and IL5) under hypergravity conditions. Only IL10 was slightly but not statistically increased in the 3G group. These finding are in agreement with those of Crucian et al. (2000) which observed, postflight in ISS crewmembers, a reduction in the IFNγ/IL10 ratio, without any modification of the IL4 serum level.

To clarify the impact of hypergravity on antibodies synthesis, we have quantified the three major serum isotypes. No change in IgM concentration was observed in the three groups of mice, as it was previously obtained with *P. waltl*, whose IgM transcripts were not increased after immunisation during spaceflight (Boxio et al., 2005). Contrariwise, we have recently shown that somatic hypermutation occurs at a lower frequency in heavy chain variable (VH) domains of specific IgM antibodies in flown immunized *P. waltl*, which could perhaps reduce antibody affinities (Bascove et al., in press). It is noteworthy that these modifications were not due to a decrease in food intake, since the animals were force-fed during the flight. In our experiment, IgA concentration was slightly increased for 2G mice, while for 3G mice it remained similar to control. This result is in accordance with our previous observation in flown *P. waltl* whose expression of IgY heavy chains (the counterpart of mammalian IgA molecules) was increased. Lastly, a higher IgG concentration was only observed with 2G mice, which leads us to suppose that cells producing different isotypes have different sensitivity to gravity. It likely results from the combination of several changes, such as the severe reduction in B and T cell activation and changes in the distribution of lymphocyte subpopulations and adhesion molecule expression. These findings clearly show that variation of level gravity affect the humoral immune system.

In summary, our results suggest that gravity has different consequences on the HPA axis activation and on the humoral immune system which are G-level dependent. After 21 days of 2G centrifugation, mitogen-induced response of B and T cell were impaired and the IgG concentration was increased, while mice have adapted to their new environment. However, 3G centrifugation induced a durable HPA axis activation and anxiety associated with no body mass gain, a decrease in plasmatic chemiokines and Th1 cytokines. The possibility that changes observed in the 3G group could potentially be due to a long-term effect of the potential altered food intake associated to HPA axis activation occurring at the beginning of the centrifugation remains to be clarified. Although the mechanisms must further be elucidated, these results have a strong resonance on diseases associated with chronic stress due to environmental changes where reactivated virus infections, bacterial contaminations and cancer appear as natural consequences.

Contributors

Guéguinou, N.: Performed hormone, immunoglobulins, lymphoproliferation analyses and studied the literature. Participated in animal experimentation, undertook statistical analyses and results interpretation. He wrote multiple drafts of the manuscript.

Bojados, M.: Performed animal experimentation, behavioral studies and undertook statistical analysis.

Jamon, M.: Provided guidance and expertise for behavioral and animal experimentation.

Derradji H.: Performed the cytokine assays.

Baatout, S.: Provided guidance and expertise for cytokine assays.

Tschirhart, E.: Approved the final version of the manuscript.

Frippiat, J.P.: Designed the study, contributed to results interpretation and approved the final version of the manuscript.

Legrand-Frossi, C.: Designed the study, wrote the protocol, collected the data, studied literature and contributed to results interpretation. She wrote multiple drafts of the manuscript.

All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Role of funding source

Nobody forced us in collecting and processing data.

Conflicts of interest

All authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank Dr Caroline Gilbert and Dr Frederic Suter for critical reading and suggestions. This work was supported by the French National Research Agency (ANR) (project NT_09632666-AdapHyG), French National Space Agency (CNES), the French Ministry of Higher Education and Research and Nancy-University as well as ESA/BELSPO/PRODEX grants (C90-380 and C90-391). Guéguinou N. is supported by the National Research Fund of Luxembourg. Bojados M. is supported by the P.A.C.A. Region and CNES. The authors are grateful to Dr Guillemette Gauquelin-Koch (CNES) and Dr. Pierre Coquay (ESA/BELSPO) for their constant support.

References

Aviles, H., Belay, T., Vance, M., Sonnenfeld, G., 2005. Effects of space flight conditions on the function of the immune system and catecholamine production simulated in a rodent model of hindlimb unloading. Neuroimmunomodulation 12, 173—181.

Armario, A., Escorihuela, R.M., Nadal, R., 2008. Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. Neurosci. Biobehav. Rev. 32, 1121—1135 (Review).

Balaban, C.D., Thayer, J.F., 2001. Neurological bases for balance-anxiety links. J. Anxiety Disord. 15, 53—79 (Review).

Baqai, F.P., Gridley, D.S., Slater, J.M., Luo-Owen, X., Stodieck, L.S., Ferguson, V., Chapes, S.K., Pecaut, M.J., 2009. Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. J. Appl. Physiol. 106, 1935—1942.

Bascove, M., Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Tschirhart, E., Frippiat, J.P., 2009. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. FASEB J. 23, 1607—1615.

Bascove, M., Guéguinou, N., Schaerlinger, B., Gauquelin-Koch, G., Frippiat, J.P. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. FASEB, doi:fj.11-185215.

Bouët, V., Wubbels, R.J., de Jong, H.A., Gramsbergen, A., 2004. Behavioural consequences of hypergravity in developing rats. Brain Res. Dev. Brain Res. 153, 69—78.

Bouët, V., Gahéry, Y., Lacour, M., 2003. Behavioural changes induced by early and long-term gravito-inertial force modification in the rat. Behav. Brain Res. 139, 97—104.

Boxio, R., Dournon, C., Frippiat, J.P., 2005. Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. J. Appl. Physiol. 98, 905—910.

Caren, L.D., Mandel, A.D., Nunes, J.A., 1980. Effect of simulated weightlessness on the immune system in rats. Aviat. Space Environ. Med. 51, 251—255.

Chapes, S.K., Simske, S.J., Sonnenfeld, G., Miller, E.S., Zimmerman, R.J., 1999. Effects of spaceflight and PEG-IL-2 on rat physiological and immunological responses. J. Appl. Physiol. 86, 2065—2076.

Cogoli, A., 1993. The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system. J. Leukoc. Biol. 54, 259—268.

Cogoli, A., Cogoli-Greuter, M., 1997. Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity. Review. Adv. Space Biol. Med. 6, 33—79.

Cooper, D., Pellis, N.R., 1998. Suppressed PHA activation of T lymphocytes in simulated microgravity is restored by direct activation of protein kinase C. J. Leukoc. Biol. 63, 550—562.

Crucian, B.E., Cubbage, M.L., Sams, C.F., 2000. Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. J. Interferon Cytokine Res. 20, 547—556.

Curtin, C., Carroll, I., 2009. Cutaneous neuroma physiology and its relationship to chronic pain. Review. J. Hand Surg. Am. 34, 1334—1336.

Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., 1999. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. Trends Endocrinol. Metab. 10, 359—368.

Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., 2006. Stress system — organization, physiology and immunoregulation. Neuroimmunomodulation 13, 257—267 (Review).

Erofeeva, L.M., Krasnov, I.B., Sapin, M.R., 2003. Structure and function of the thymus during adaptation of rats to hypergravitation. Bull. Exp. Biol. Med. 135, 190—193.

Felix, K., Wise, K., Manna, S., Yamauchi, K., Wilson, B.L., Thomas, R.L., Kulkarni, A., Pellis, N.R., Ramesh, G.T., 2004. Altered cytokine expression in tissues of mice subjected to simulated microgravity. Mol. Cell. Biochem. 266, 79—85.

Francia, N., Santucci, D., Chiarotti, F., Alleva, E., 2004. Cognitive and emotional alterations in periadolescent mice exposed to 2 g hypergravity field. Physiol. Behav. 83, 383—394.

Francia, N., Simeoni, M., Petruzzi, S., Santucci, D., Aloe, L., Alleva, E., 2006. Repeated acute exposures to hypergravity during early development subtly affect CD-1 mouse neurobehavioural profile. Brain Res. Bull. 69, 560—572.

Fuller, P.M., Jones, T.A., Jones, S.M., Fuller, C.A., 2002. Neurovestibular modulation of circadian and homeostatic regulation: vestibulohypothalamic connection? Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 15723—15728.

Gliddon, C.M., Smith, P.F., Darlington, C.L., 2003. Interaction between the hypothalamic—pituitary—adrenal axis and behavioural compensation following unilateral vestibular deafferentation. Acta Otolaryngol. 123 (9), 1013—1021.

Gmünder, H., Roth, S., Eck, H.P., Gallas, H., Mihm, S., Dröge, W., 1990. Interleukin-2 mRNA expression, lymphokine production and DNA synthesis in glutathione-depleted Tcells. Cell. Immunol. 130, 520—528.

Goldstein, O., Ishay, J.S., 1998. The white blood cell line: changes induced in mice by hypergravity. Adv. Space Res. 21, 1333—1343.

Gould, C.L., Lyte, M., Williams, J., Mandel, A.D., Sonnenfeld, G., 1987. Inhibited interferon but normal interleukin-3 production from rats flown on the space shuttle. Aviat. Space Environ. Med. 58, 983—986.

Gridley, D.S., Slater, J.M., Luo-Owen, X., Rizvi, A., Chapes, S.K., Stodieck, L.S., Ferguson, V.L., Pecaut, M.J., 2009. Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. J. Appl. Physiol. 106, 194—202.

Grigorenko, D.E., Krasnov, I.B., Sapin, M.R., 2003. Structural and functional organisation of the spleen lymphoid tissue after exposure to hypergravitation. Morfologiia 123, 60—64.

Grove, D.S., Pishak, S.A., Mastro, A.M., 1995. The effect of a 10-day space flight on the function, phenotype, and adhesion molecule expression of splenocytes and lymph node lymphocytes. Exp. Cell. Res. 219, 102—109.

Guéguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J.L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C., Frippiat, J.P., 2009. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? J. Leukoc. Biol. 86, 1027—1038.

Ishizawa, M., Iwasaki, K., Kato, S., Makishima, M., 2009. Hypergravity modulates vitamin D receptor target gene mRNA expression in mice. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 297, 728—734.

Jamon, M., Serradj, N., 2008. Ground-based researches on the effects of altered gravity on mice development. Microgravity Sci. Technol. 21, 327—337.

Johnson, E.O., Kamilaris, T.C., Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. Neurosci. Biobehav. Rev. 16, 115—130 (Review).

Kimzey, S.L., Johnson, P.C., Ritzman, S.E., Mengel, C.E., 1976. Hematology and immunology studies: the second manned Skylab mission. Aviat. Space Environ. Med. 47, 383—390.

Kita, S., Shibata, S., Kim, H., Otsubo, A., Ito, M., Iwasaki, K., 2006. Dose-dependent effects of hypergravity on body mass in mature rats. Aviat. Space Environ. Med. 77, 842—845.

Konstantinova, I.V., Rykova, M.P., Lesnyak, A.T., Antropova, E.A., 1993. Immune changes during long-duration missions. J. Leukoc. Biol. 54, 189—201 (Review).

Kopydlowski, K.M., McVey, D.S., Woods, K.M., Iandolo, J.J., Chapes, S.K., 1992. Effects of antiorthostatic suspension and corticosterone on macrophage and spleen cell function. J. Leukoc. Biol. 52, 202—208.

Lebsack, T.W., Fa, V., Woods, C.C., Gruener, R., Manziello, A.M., Pecaut, M.J., Gridley, D.S., Stodieck, L.S., Ferguson, V.L., Deluca, D., 2010. Microarray analysis of spaceflown murine thymus tissue reveals changes in gene expression regulating stress and glucocorticoid receptors. J. Cell. Biochem. 110, 372—381.

Lesnyak, A.T., Sonnenfeld, G., Rykova, M.P., Meshkov, D.O., Mastro, A., Konstantinova, I., 1993. Immune changes in test animals during spaceflight. J. Leukoc. Biol. 54, 214—226 (Review).

Lesnyak, A.T., Sonnenfeld, G., Avery, L., Konstantinova, I., Rykova, M., Meshkov, D., Orlova, T., 1996. Effect of SLS-2 spaceflight on immunologic parameters of rats. J. Appl. Physiol. 81, 178—182.

Macho, L., Kvetnansky, R., Nemeth, S., Fickova, M., Popova, I., Serova, L., Grigoriev, A.I., 1996. Effects of space flight on endocrine system function in experimental animals. Environ. Med. 40, 95—111.

Miller, E.S., Bates, R.A., Koebel, D.A., Sonnenfeld, G., 1999. Antiorthostatic suspension stimulates profiles of macrophage activation in mice. Neuroimmunomodulation 6, 160—167.

Mizobe, K., Kishihara, K., Ezz-Din El-Naggar, R., Madkour, G.A., Kubo, C., Nomoto, K., 1997. Restraint stress-induced elevation of endogenous glucocorticoid suppresses migration of granulocytes and macrophages to an inflammatory locus. J. Neuroimmunol. 73, 81—89.

Moran, M.M., Stein, T.P., Wade, C.E., 2001. Hormonal modulation of food intake in response to low leptin levels induced by hypergravity. Exp. Biol. Med. 226, 740—745.

Morey-Holton, E., Globus, R.K., Kaplansky, A., Durnova, G., 2005. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. Adv. Space Biol. Med. 10, 7—40 (Review).

Mukaida, N., Zachariae, C.C., Gusella, G.L., Matsushima, K., 1991. Dexamethasone inhibits the induction of monocyte chemotactic-activating factor production by IL-1 or tumor necrosis factor. J. Immunol. 146, 1212—1215.

Nickerson, C.A., Ott, C.M., Mister, S.J., Morrow, B.J., Burns-Keliher, L., Pierson, D.L., 2000. Microgravity as a novel environmental signal affecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. Infect. Immun. 68, 3147—3152.

O'Donnell, P.M., Orshal, J.M., Sen, D., Sonnenfeld, G., Aviles, H.O., 2009. Effects of exposure of mice to hindlimb unloading on leukocyte subsets and sympathetic nervous system activity. Stress 12, 82—88.

Ortiz, R.M., Wang, T.J., Wade, C.E., 1999. Influence of centrifugation and hindlimb suspension on testosterone and corticosterone excretion in rats. Aviat. Space Environ. Med. 70, 499—504.

Pecaut, M.J., Nelson, G.A., Peters, L.L., Kostenuik, P.J., Bateman, T.A., Morony, S., Stodieck, L.S., Lacey, D.L., Simske, S.J., Gridley, D.S., 2003. Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. I. Immune population distributions. J. Appl. Physiol. 94, 2085—2094.

Pecaut, M.J., Miller, G.M., Nelson, G.A., Gridley, D.S., 2004. Hypergravity-induced immunomodulation in a rodent model: hematological and lymphocyte function analyses. J. Appl. Physiol. 97, 29—38.

Perna, G., Dario, A., Caldirola, D., Stefania, B., Cesarani, A., Bellodi, L., 2001. Panic disorder: the role of the balance system. J. Psychiatr. Res. 35, 279—286.

Petrak, J., Mravec, B., Jurani, M., Baranovska, M., Tillinger, A., Hapala, I., Frollo, I., Kvetnanský, R., 2008. Hypergravity-induced increase in plasma catecholamine and corticosterone levels in telemetrically collected blood of rats during centrifugation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1148, 201—208.

Romagnani, P., Maggi, L., Mazzinghi, B., Cosmi, L., Lasagni, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Angeli, R., Rotondi, M., Filì, L., Parronchi, P., Serio, M., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2005. CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. J. Allergy Clin. Immunol. 116, 1372—1379.

Rykova, M.P., Gertsik, Iu.G., Antropova, E.N., Buravkova, L.B., 2006. Immunoglobulin E and allergen-specific IgE antibodies in cosmonauts before and after long-duration missions on the International Space Station. Aviakosm. Ekolog. Med. 40, 19—22 (Russian).

Santucci, D., Corazzi, G., Francia, N., Antonelli, A., Aloe, L., Alleva, E., 2000. Neurobehavioural effects of hypergravity conditions in the adult mouse. Neuroreport 11, 3353—3356.

Santucci, D., Francia, N., Trincia, V., Chiarotti, F., Aloe, L., Alleva, E., 2009. A mouse model of neurobehavioural response to altered gravity conditions: an ontogenetical study. Behav. Brain Res. 197, 109—118.

Schmitt, D.A., Schwarzenberg, M., Tkaczuk, J., Hebrard, S., Brandenberger, G., Mauco, G., Cogoli-Greuter, M., Abbal, M., 2000. Head-down tilt bed rest and immune responses. Pflugers Arch. 441, R79—84.

Shearer, W.T., Ochs, H.D., Lee, B.N., Cohen, E.N., Reuben, J.M., Cheng, I., Thompson, B., Butel, J.S., Blancher, A., Abbal, M., Aviles, H., Sonnenfeld, G., 2009. Immune responses in adult female volunteers during the bed-rest model of spaceflight: antibodies and cytokines. J. Allergy Clin. Immunol. 123, 900—905.

Sonnenfeld, G., Butel, J.S., Shearer, W.T., 2003. Effects of the space flight environment on the immune system. Rev. Environ. Health 18, 1—17.

Sonnenfeld, G., Davis, S., Taylor, G.R., Mandel, A.D., Konstantinova, I.V., Lesnyak, A., Fuchs, B.B., Peres, C., Tkackzuk, J., Schmitt, D.A., 1996. Effect of space flight on cytokine production and other immunologic parameters of rhesus monkeys. J. Interferon Cytokine Res. 16, 409—415.

Sonnenfeld, G., Foster, M., Morton, D., Bailliard, F., Fowler, N.A., Hakenewerth, A.M., Bates, R., Miller Jr., E.S., 1998. Spaceflight and development of immune responses. J. Appl. Physiol. 85, 1429—1433.

Sonnenfeld, G., Mandel, A.D., Konstantinova, I.V., Berry, W.D., Taylor, G.R., Lesnyak, A.T., Fuchs, B.B., Rakhmilevich, A.L., 1992. Spaceflight alters immune cell function and distribution. J. Appl. Physiol. 73, 191S—195S.

Sonnenfeld, G., Morey, E.R., Williams, J.A., Mandel, A.D., 1982. Effect of a simulated weightlessness model on the production of rat interferon. J. Interferon Res. 2, 467—470.

Stowe, R.P., Sams, C.F., Mehta, S.K., Kaur, I., Jones, M.L., Feeback, D.L., Pierson, D.L., 1999. Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. J. Leukoc. Biol. 65, 179—186.

Uchakin, P.N., Cubbage, M.L., Sams, C.F., Morukov, B.V., Larina, I.V., Bobrovnik, E.B., 1998. Effects of the 120 days of head-down bed rest on cytokine secretion and its in vitro modulation by glucocorticoids. J. Gravit. Physiol. 5, 171—172.

Voss Jr., E.W., 1984. Prolonged weightlessness and humoral immunity. Science 225, 214—215.

Wade, C.E., Gerald, S., 2005. Responses across the gravity continuum: hypergravity to microgravity. Adv. Space Biol. Med. 10, 225—245.

Webster-Marketon, J.I., Glaser, R., 2008. Stress hormones and immune function. Cell. Immunol. 252, 16—26 (Review).

Wilson, J.W., Ramamurthy, R., Porwollik, S., McClelland, M., Hammond, T., Allen, P., Ott, C.M., Pierson, D.L., Nickerson, C.A., 2002. Microarray analysis identifies Salmonella genes belonging to the lowshear modeled microgravity regulon. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 13807—13812.

Wilson, J.W., Ott, C.M., Höner zu Bentrup, K., Ramamurthy, R., Quick, L., Porwollik, S., Cheng, P., McClelland, M., Tsaprailis, G., Radabaugh, T., Hunt, A., Fernandez, D., Richter, E., Shah, M., Kilcoyne, M., Joshi, L., Nelman-Gonzalez, M., Hing, S., Parra, M., Dumars, P., Norwood, K., Bober, R., Devich, J., Ruggles, A., Goulart, C., Rupert, M., Stodieck, L., Stafford, P., Catella, L., Schurr, M.J., Buchanan, K., Morici, L., McCracken, J., Allen, P., Baker-Coleman, C., Hammond, T., Vogel, J., Nelson, R., Pierson, D.L., Stefanyshyn-Piper, H.M., Nickerson, C.A., 2007. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 16299—16304.

Yuwaki, K., Okuno, M., 2003. Changes in food intake and growth rate in mice under hypergravity. Biol. Sci. Space 17, 219—220.

Yuwaki, K., Okuno, M., 2004. Relationship between the stress of hyper-gravity and food intake and growth rate in mouse. Biol. Sci. Space 18, 175—176.

PARTIE 4

CONTREMESURES PHARMACOLOGIQUES

Contremesures pharmacologiques pour contrecarrer les altérations du système immunitaire associées à un vol spatial

1. Introduction

Les vols spatiaux ont des effets néfastes sur les cellules du système immunitaire (voir publication 1 pour revue). Par exemple, l'IL2 ainsi que son récepteur voient leur expression modifiée suite à un vol spatial (Cogoli *et al.*, 1984). De plus, une baisse de la production des cytokines Th1 se produit lors d'un vol spatial (Crucian *et al.*, 2000). Des études concernant la production d'anticorps suite à un vol n'ont montré aucune variation après un vol de courte durée mais des modifications ont été observées suite à des vols de longue durée.

Il est donc primordial de développer des stratégies pour contrer les effets délétères d'un vol spatial sur le système immunitaire, d'autant que des vols de très longue durée sont prévus dans les années à venir. Plusieurs pistes pharmacologiques semblent améliorer les fonctions immunitaires suite à un ou plusieurs stress rencontrés lors d'un vol spatial. Ce chapitre de livre détaille les effets bénéfiques pour le système immunitaire des antioxydants, des nucléotides, de l'AHCC ou encore de la DHEA.

2. Effets des antioxydants

Durant un vol spatial, les radiations cosmiques ou les rayonnements γ augmentent considérablement le stress oxydatif. Plusieurs études ont pu mettre en évidence ce phénomène même après un vol de courte durée (Fleming *et al.*, 1991 ; Smith & Zwart, 2008). Des antioxydants tels que la L-sélénométhionine, la vitamine C, le succinate de la vitamine E, l'acide α-lipoïque ou encore la N-acétylcystéine sont capables d'augmenter la survie de souris lorsqu'elles ont été exposées à un rayonnement de protons ou bien à une forte dose de rayons X (Wambi *et al.*, 2008 ; 2009). Ces molécules sont également capables de prévenir l'apoptose des leucocytes de la moelle osseuse et du sang en favorisant l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire (protéine Bcl2 par exemple) ou la réparation de l'ADN (Kennedy *et al.*, 2004) et en diminuant l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose (la Caspase 9 et la protéine Bax par exemple). Les antioxydants semblent ainsi être de bons candidats pour contrer les effets délétères sur les cellules du système immunitaire des radiations subies lors d'un séjour spatial (Wambi *et al.*, 2008 ; 2009).

3. Effets des nucléotides

Les nucléotides sont capables de moduler le système immunitaire (Holen *et al.*, 2006). En effet, ils permettent de favoriser la maturation, l'activation et la prolifération des lymphocytes, d'augmenter la phagocytose des macrophages ou encore de favoriser la synthèse des immunoglobulines (Navarro *et al.*, 1996 ; Nagafuchi *et al.*, 2000 ; Maldonado *et al.*, 2001). Par exemple, Hales *et al.* (2002) et Kulkarni *et al.* (2002 ; 2005) ont montré que la baisse de la réponse à un mitogène *in vitro* de splénocytes soumis à la microgravité est compensée par l'ajout dans le milieu de culture d'uridine ainsi que par un cocktail nucléosides-nucléotides. Ces molécules permettent également d'augmenter la synthèse de l'IL1β, de l'IL2 et de l'IFNγ. Des études *in vivo* ont montré des effets semblables (Kulkarni *et al.*, 2002 ; 2005 ; Yamauchi *et al.*, 2002). De plus, il a pu être mis en évidence une baisse du taux d'hormones de stress dans le sang chez le rongeur suite à un traitement par des nucléotides. Ainsi, les nucléotides ont un effet anti-stress et sont capables de potentialiser la réponse des cellules du système immunitaire, altérée en microgravité. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels ces molécules agissent sur les cellules du système immunitaires restent flous.

4. Effets de l'AHCC

L'AHCC (Active Hexose Correlated Compound) est un composé extrait de champignons (Basidiomycètes) contenant essentiellement des polysaccharides et des acides aminés. Il est largement utilisé en médecine alternative au Japon et y est disponible sans prescription médicale. Ce composé a un effet positif sur le système immunitaire puisqu'il augmente la résistance à l'infection par le virus de la grippe, protège les thymocytes de l'apoptose induite par la dexaméthasone, augmente l'activité des cellules NK et la production de l'IL12 (Burikhanov *et al.*, 2000 ; Matsui *et al.*, 2002 ; Yagita *et al.*, 2002 ; Nogusa *et al.*, 2009). Aviles *et al.* (2004) ont administré ce composé à des souris soumises à une suspension anti-orthostatique et infectées par la bactérie *Klebsiella pneumoniae* et ont pu observer une augmentation du taux de survie des IgG contre ce pathogène. Notons que l'AHCC a aussi un effet positif sur le système immunitaire de souris non soumises à une suspension anti-orthostatique. Enfin, l'AHCC est capable d'augmenter la production des cytokines Th1 (Aviles *et al.*, 2004) dont la synthèse est diminuée lors d'un vol spatial (Gridley *et al.*, 2003 ; Crucian *et al.*, 2008). Ainsi, cet extrait de Basidiomycète est un bon protecteur de l'organisme contre les infections.

5. Effets de la DHEA

La DHEA (déhydroépiandrostérone) est une hormone synthétisée par les cellules du cortex de la glande surrénale lors d'un stress (Kroboth *et al.*, 1999). Cette hormone possède des propriétés immunomodulatrices et des effets anti-glucocorticoïdes. En effet, cette hormone est connue pour limiter les problèmes immunitaires associés à l'âge (Straub *et al.*, 1998). De plus, elle permet d'augmenter la résistance aux infections bactériennes et virales (Zhang *et al.*, 1999) et favorise l'activité des ploynucléaires neutrophiles (Radford *et al.*, 2010). Cependant, plusieurs études ont montré des effets contradictoires de cette molécule sur la production des cytokines Th1 et Th2. Ainsi, le rôle de cette hormone sur les cytokines n'est pas encore clairement établi. Malgré cela, il apparaît que la DHEA est capable de limiter les effets du stress sur le système immunitaire.

6. Conclusion

Les différentes molécules présentées ci-dessus ont des effets bénéfiques sur le système immunitaire. Certaines ont un rôle protecteur sur l'ensemble du système immunitaire, comme les antioxydants ou la DHEA. D'autres agissent plus spécifiquement sur un composant du système immunitaire comme l'AHCC qui agit surtout sur les cellules du système immuitaire naturel. Ces molécules sont donc de bons candidats pour contrecarrer l'altération du système immunitaire lors d'un vol spatial.

CHAPITRE DE LIVRE

Stress Challenges and Immunity in Space, 2012

Pharmacological Countermeasures to Spaceflight-Induced Alterations of the Immune System

30

Nathan Guéguinou, Matthieu Bascove, and Jean-Pol Frippiat

30.1 Introduction

Opportunities for microbes to establish infections are enhanced under spaceflight conditions because space travel stimulates their growth (Chap. 15) and has a negative impact on immune functions. Indeed, it has been shown that spaceflight affects lymphoid organs (Gridley et al. 2003; Baqai et al. 2009) and induces variations in peripheral blood leukocyte subsets (Chap. 9). Neutrophil, monocyte, and NK cell functions are affected by spaceflight (Chaps. 10–12). The activation of T lymphocytes is also severely depressed under low gravity conditions (Cogoli et al. 1984) because interleukin-2 (IL-2) and IL-2receptor gene expression are modified, the delivery of the costimulatory signal to activate the B7/CD28 pathway and the protein kinase A (PKA) signaling pathway, which is a key early regulator in T cell activation, are hindered. Furthermore, a TH2 cytokine shift is associated with spaceflight. If this TH2 shift persists during long missions, it could represent a significant clinical risk for TH2-related autoimmune diseases, allergies, hypersensitivities, and disease susceptibility related to diminished cell-mediated immunity. Studies on plasma antibody levels did not reveal significant changes after short spaceflights (Rykova et al. 2008), but contradictory results were reported after long missions. Indeed, several studies (Konstantinova et al. 1993; Bascove et al. 2008, 2009; Guéguinou et al. 2009, 2010) reported increased levels of immunoglobulin while Rykova et al. (2008) reported normal amounts of antibodies after prolonged space missions. Lastly, a differential sensitivity of cellular and humoral immunity to spaceflight conditions seems to exist because it was shown that the cellular, but not the humoral, systems are affected by short periods of flight.

N. Guéguinou • M. Bascove • J.-P. Frippiat (✉)
Faculty of Medicine, Nancy-University, Henri Poincaré University, Development and Immunogenetics, Vandœuvre-lès-Nancy, France
e-mail: jean-pol.frippiat@scbiol.uhp-nancy.fr

A. Choukèr (ed.), *Stress Challenges and Immunity in Space*,
DOI 10.1007/978-3-642-22272-6_30, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Taken together, these data demonstrate that spaceflight-induced modifications of the immune system could have an immediate impact on mission objectives. The development of efficient countermeasures to combat the deleterious effects of spaceflight on the immune system is therefore an area that should be considered more thoroughly before we undertake prolonged space voyages. Furthermore, the observations presented above are also found in the elderly (Cancro et al. 2009) and people subjected to chronic or acute stress (see Chap. 4). Indeed, the age-associated decline in immune function, which is known as immunosenescence, is characterized by a large dysfunction in innate and adaptive immune system responses (for review see Weiskopf et al. 2009). Chronic stress reduces B and T lymphocyte responses and lowers antibody production (Glaser et al. 2000). Acute stress induces the reactivation of latent viruses, decreases NK cell activity, increases interleukin-6 (IL-6) secretion, and increases neutrophil numbers in peripheral blood (Glaser and Kiecolt-Glaser 2005). Finding countermeasures to spaceflight-associated immune alterations are therefore also of interest to counter immunosenescence and the effects of stress-inducing situations on Earth.

30.2 Effect of Combined Antioxidant Treatment

Increased oxidative stress, which is harmful for cells and can induce many disorders, has been observed after radiation exposure and is associated with spaceflight (Stein and Leskiw 2000; Wan et al. 2005). Indeed, lipopolysaccharide (LPS)-activated splenocytes from mice that flew on the space shuttle mission STS-118 produced more IL-6 and interleukin-10 (IL-10) and less tumor necrosis factor (TNF)-α than control mice (Baqai et al. 2009). The same study showed that many of the genes responsible for scavenging reactive oxygen species (ROS) were upregulated after the flight, suggesting that cells attempted to scavenge ROS produced during spaceflight. An increase in the superoxide response by murine polymorphonuclear neutrophils was also reported even after short periods of microgravity (Fleming et al. 1991). Furthermore, it was shown that the urinary concentration of 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine, a marker of oxidative damage to DNA, was higher and that red blood cell superoxide dismutase, an antioxidant enzyme that functions as a superoxide radical scavenger, was lower in astronauts after long-duration spaceflight (Smith and Zwart 2008). Consequently, research was undertaken to determine if antioxidants could protect organisms from radiation-induced oxidative stress. Two studies showed that a mixture of L-selenomethionine (SeM), vitamin C, vitamin E succinate, alpha-lipoic acid, and *N*-acetyl cysteine improved the survival of mice after exposure to protons or to a potentially lethal dose of X-rays (Wambi et al. 2008, 2009) (Table 30.1). Pretreatment of mice with this mixture of antioxidants resulted in significantly higher total white blood cell and neutrophil counts in the peripheral blood and increased bone marrow cell counts after irradiation. Moreover, antioxidants increased Bcl-2 (B cell lymphoma-2, proteins regulating anti-apoptotic mechanisms) and decreased Bax (Bcl-associated X protein promoting apoptosis), caspase 9, and TGF (transforming growth factor)-β1 mRNA expression in the bone marrow after X-ray irradiation (Wambi et al. 2008). In mice or rats exposed to high-energy

particles radiation, D- or L-SeM or a combination of selected antioxidant agents, which included SeM, could also prevent the decrease in total antioxidants by regulating the expression of genes involved in the repair of radiation-induced DNA damage (Kennedy et al. 2004, 2007). These data indicate that antioxidants, alone or in combination, are promising countermeasures for protection against adverse biological effects from space radiation.

30.3 Nucleotides

Nucleotides are beneficial for health because they positively influence lipid metabolism, immunity, and tissue growth, development, and repair (Gil 2002). Rapidly proliferating tissues, such as those of the immune system, are not able to fulfill the

Table 30.1 Effect of countermeasures on immune parameters

Countermeasure	Experiment performed	Results	References
Antioxidants	Irradiated mice + antioxidants	– Antioxidants prevented the decrease of the antioxidant status of animals exposed to protons or high-energy particles	Kennedy et al. 2007
	Irradiated mice (X-rays) + antioxidants	– ↑ survival – ↑ white blood cells and neutrophils in blood – ↑ bone marrow cell counts – ↑ Bcl-2 mRNA in bone marrow – ↓ Bax, caspase 9 & TGF-β1 mRNA in bone marrow	Wambi et al. 2008
Nucleotides	*In vitro* Mouse splenocytes cultured under simulated microgravity conditions and stimulated with PHA + nucleotides	– Nucleoside-nucleotide mixture and uridine restored splenocyte proliferation – ↑ IL-1β, IL-2 & IFN-γ with the nucleoside-nucleotide mixture	Hales et al. 2002
	In vivo Hindlimb-unloaded mice + nucleotides	– RNA and uracil restored popliteal lymph node proliferation, PHA-induced proliferation of splenocytes, IL-2 & IFN-γ production	Kulkarni et al. 2002, 2005
	In vitro Mouse splenocytes cultured under simulated microgravity conditions and stimulated with PHA + nucleotides	– PHA-induced proliferation of splenocytes restored by uridine and nucleoside-nucleotide mixture	Kulkarni et al. 2002, 2005
	In vivo Hindlimb-unloaded mice + nucleotides	– ↑ proliferation – ↑ IL-2 & IFN-γ – ↓ corticosterone plasma level	Yamauchi et al. 2002

(continued)

Table 30.1 (continued)

Countermeasure	Experiment performed	Results	References
AHCC	Hindlimb-unloaded mice infected with *K. pneumoniae* + AHCC	– ↓ mortality – ↑ time to death and ability to clear bacteria – ↑ anti-*K. pneumoniae* IgG levels	Aviles et al. 2003
	Normally housed mice + AHCC	– ↑ spleen cell proliferation induced by Con-A or LPS – ↑ IL-2 & IFN-γ after Con-A stimulation – ↑ IL-4, IL-6 & IL-10 after LPS stimulation – ↑ nitric oxide production in peritoneal cells	Aviles et al. 2004
	Hindlimb-unloaded mice + AHCC	– No effect on splenocyte proliferation induced by Con-A or LPS – ↑ IL-2 & IFN-γ after Con-A stimulation – ↑ nitric oxide production in peritoneal cells – Restored peritoneal cell function	Aviles et al. 2004
DHEA	*In vitro* KLH-primed mouse splenocytes stimulated with KLH + DHEA	*TH2 favored* – ↑ IL-4 – ↓ IFN-γ	Du et al. 2001
	In vitro Mouse splenocytes stimulated with Con-A and LPS + DHEA	– ↓ IL-1, IL-2 & IFN-γ – ↑ IL-10 – IL-4, IL-6 & TNF-α not affected	Powel and Sonnenfeld 2006
	In vivo Retrovirus infected mice + DHEA	*TH1 favored* – ↑ IL-2 & IFN-γ – ↓ IL-6 & TNF-α	Araghi-Niknam et al. 1997
	In vivo Old female mice + DHEA	– ↑ IL-2 & IFN-γ – ↓ IL-6 & IL-10	Inserra et al. 1998

Arrows indicate up and down modulations

needs of cell nucleotides exclusively by de novo synthesis and consequently use the salvage pathway that recovers nucleotides from the blood and diet. Nucleotides modulate the immune system (Nagafuchi et al. 1997; Holen et al. 2006). They influence lymphocyte maturation, activation, and proliferation. Likewise, they affect lymphocyte subset populations in the blood and are involved in enhancing macrophage phagocytosis and delayed hypersensitivity as well as allograft and tumor responses. In addition, they contribute to the immunoglobulin response (Navarro et al. 1996; Nagafuchi et al. 1997; Maldonado et al. 2001), which has a positive effect on clearing infection. The molecular mechanisms by which

nucleotides modulate the immune system are largely unknown. Nucleotides may influence protein biosynthesis as well as signal membrane transduction mediated by the interaction of exogenous nucleosides and their receptors. They may also contribute to modulating the expression of a number of genes, including those involved in the immune system.

Because nutrient absorption and metabolism appear to be altered under spaceflight conditions (see Chap. 29), several studies have analyzed the effects of an exogenous source of nucleotides on immune function using ground-based models of microgravity. Hales et al. (2002) and Kulkarni et al. (2002, 2005) have shown that the decreased splenocyte proliferation in response to phytohemagglutinin (PHA) under simulated microgravity can be restored by a nucleoside-nucleotide mixture and uridine but not by inosine. This observation indicates that pyrimidines are more effective for immunoprotection of the hosts (Table 30.1). In vitro studies also revealed that cultured splenocytes secreted more IL-1β, IL-2, and interferon (INF)-γ in the presence of a nucleoside-nucleotide mixture. In addition, Kulkarni et al. (2002, 2005) performed in vivo studies that demonstrated that popliteal lymph node proliferation, PHA-induced splenocyte proliferation, and IL-2 and IFN-γ production, which are significantly suppressed in hindlimb-unloaded mice (a ground-based model of choice for simulating spaceflight conditions on Earth (Morey-Holton and Globus 2002)), are restored by RNA and uracil. Similarly, Yamauchi et al. (2002) showed that in hindlimb-unloaded mice, nucleotides significantly increased in vivo lymph node proliferation and ex vivo lymphoproliferation response to alloantigen and mitogens, respectively, and IL-2 and IFN-γ production. Moreover, a lower plasma corticosterone level was observed in hindlimb-unloaded mice with RNA and uracil-supplemented diet. Thus, nucleotides and especially uracil/uridine possess immunoprotective effects. These molecules are therefore potential countermeasures for the observed immune dysfunction associated with space travel.

30.4 AHCC

Another interesting compound is the active hexose-correlated compound (AHCC). AHCC is an extract prepared from cocultured mycelia of several species of *Basidiomycete* mushrooms that contains 40% of polysaccharides (β-glucan and acetylated α-glucan which are known to have immune-stimulating effects), amino acids, and minerals. Despite the fact that it is not yet an approved drug, AHCC is the second most popular complementary and alternative medicine used by cancer patients in Japan. It is available to the general public without a prescription. Its legal status is that of a functional food. AHCC may help in the treatment of cancer. Indeed, a cohort study showed a significantly longer no recurrence period and an increased overall survival rate in 113 postoperative liver cancer patients taking AHCC (Matsui et al. 2002). Another study showed that AHCC significantly enhanced cisplatin-induced antitumor effect (Hirose et al. 2007). Several studies have shown that this product has also a positive effect on human and rodent immune systems, including the enhancement of host resistance to influenza and West Nile viruses, the prevention of

thymic apoptosis induced by dexamethasone, the increase of natural killer cell activity, and the induction of IL-12 production (Burikhanov et al. 2000; Matsui et al. 2002; Yagita et al. 2002; Nogusa et al. 2009; Wang et al. 2009). Consequently, it was tested on hindlimb-unloaded mice that present decreased resistance to bacterial infections (*Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*) (Belay et al. 2002; Aviles et al. 2003). Indeed, hindlimb unloaded mice showed significantly increased mortality and reduced mean time to death, increased levels of corticosterone, reduced ability to clear bacteria from their organs, and delayed production of anti-*P. aeruginosa* IgG antibodies, by comparison with controls. Aviles et al. (2003) showed that the administration of AHCC for one week before suspension and throughout the 10-day suspension period yielded significant beneficial effects for hindlimb-unloaded mice infected with *K. pneumoniae*, including decreased mortality, increased time to death, and increased ability to clear bacteria (Table 30.1). Furthermore, mice receiving AHCC independent of the type of treatment (hindlimb-unloaded or normally caged) had higher anti-*K. pneumoniae* IgG antibody levels. The same team later demonstrated that AHCC significantly enhanced the function of the immune system in normally housed mice but only enhanced the TH1 response in mice under hindlimb-unloading conditions (Aviles et al. 2004) (Table 30.1). Interestingly, TH1 cytokine production has been shown to be depressed after short- and long-duration missions on the International Space Station (Crucian et al. 2008). Indeed, both groups of astronauts had a low IFN-γ to IL-10 secretion ratio on the day of landing after activation of peripheral blood T cells with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. This observation was confirmed by another study performed on PHA-stimulated splenocytes from mice flown on STS-108, which revealed that both IL-2 and IFN-γ were significantly lower after the flight (Gridley et al. 2003) indicating that a shift toward the TH2 subset is associated with spaceflight. AHCC also restored peritoneal cell functions that are suppressed by hindlimb-unloading and increased nitric oxide production in peritoneal cells isolated from hindlimb-unloaded mice. Other studies showed that AHCC enhanced resistance to infection. In a mouse model of surgical wound infection, mice receiving AHCC were better able to clear bacteria from their systems than control animals (Aviles et al. 2006). AHCC also increased immune function that resulted in a lower bacterial load in a murine model of intramuscular infection (Aviles et al. 2008). In conclusion, AHCC appears to be an efficient immunoenhancer that restores innate immunity, which is greatly affected by hindlimb-unloading, and consequently represents another countermeasure with great potential that warrants further investigation.

30.5 DHEA

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is one of the major circulating adrenal cortical hormones in humans and many other warm-blooded animals. This hormone is secreted by the adrenal cortex in response to stress (Kroboth et al. 1999). In the plasma, DHEA is predominantly present as DHEA-S that generates DHEA after cleavage of the sulfate group. For many years, the physiological significance of

DHEA remained elusive. However, many studies have now shown that DHEA has significant immune modulatory functions, exhibiting both immune stimulatory and anti-glucocorticoid effects (for review see Hazeldine et al. 2010). DHEA-S increases superoxide generation in primed human neutrophils in a dose-dependent fashion, thereby impacting a key bactericidal mechanism (Radford et al. 2010). In murine models, exogenous DHEA counteracts stress-induced glucocorticoid immunosuppression and increases the resistance of mice to viral and bacterial infections (Ben et al. 1999; Zhang et al. 1999). In murine model systems of aging, DHEA appears to reverse the immunological defects seen as a consequence of aging. In particular, DHEA increases the ability of old mice to resist experimental viral and bacterial disease (Daynes et al. 1993; Kalimi and Regelson 1990; Straub et al. 1998). DHEA administration also restores immune function after thermal and trauma-hemorrhage injury and reduces mortality rates from septic challenge (Knoferl et al. 2003). In addition, DHEA provides protection against several diseases, including diabetes, oncological disorders, autoimmune disease, and chronic inflammatory illness (Kalimi and Regelson 1990). DHEA appears to be a potent regulator of cytokine production supporting the idea that this molecule acts on T cells, which is the lynch pin of the adaptive immune response. However, conflicting results on cytokine production in the presence of DHEA have been reported (see Table 30.1). In vitro studies (Du et al. 2001; Powell and Sonnenfeld 2006) showed that DHEA may be an important factor for increasing TH2 cytokine synthesis, which encourage vigorous antibody production and are commonly associated with antibody responses important for resisting infection, and decreasing TH1 and proinflammatory cytokine production. However, DHEA has shown an opposite effect in vivo in which a TH2 downregulation (or TH1 upregulation) associated with DHEA administration has been found in old or retrovirus-infected mice (Inserra et al. 1998; Zhang et al. 1999; Araghi-Niknam et al. 1997). These discrepancies may reflect differences in assays used to determine DHEA effects on cytokine production or differences in animals used. Additionally, whereas in vitro DHEA is protected from biomodifications, in vivo DHEA administration could lead to rapid clearance from the blood and conversion to other steroids in peripheral tissue, which can affect T cells differently from DHEA. Despite these contradictory data, DHEA seems to be an interesting countermeasure to fight the effects of spaceflight-associated stress on the immune system.

30.6 Conclusion

The combination of antioxidants and the pharmacologic, immune-directed action of nucleotides, AHCC and DHEA show various degrees of efficiency to restore immune system alterations. Some of these molecules are able to restore one part of the immune response such as AHCC, which mainly restores innate immunity, while others, like antioxidants, have a more general action on the organism. Searching for efficient countermeasures is a promising area of research that deserves more investigation to counter or restore alterations of the immune system in Space and on Earth.

Acknowledgments JPF and his team were supported by the French National Space Agency (CNES).

References

Araghi-Niknam M, Zhang Z, Jiang S et al (1997) Cytokine dysregulation and increased oxidation is prevented by dehydroepiandrosterone in mice infected with murine leukemia retrovirus. Proc Soc Exp Biol Med 216:386–891

Aviles H, Belay T, Fountain K et al (2003) Active hexose correlated compound enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* infection in mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. J Appl Physiol 95:491–496

Aviles H, Belay T, Vance M et al (2004) Active hexose correlated compound enhances the immune function of mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. J Appl Physiol 97:1437–1444

Aviles H, O'Donnell P, Sun B et al (2006) Active hexose correlated compound (AHCC) enhances resistance to infection in a mouse model of surgical wound infection. Surg Infect (Larchmt) 7:527–535

Aviles H, O'Donnell P, Orshal J et al (2008) Active hexose correlated compound activates immune function to decrease bacterial load in a murine model of intramuscular infection. Am J Surg 195:537–545

Baqai FP, Gridley DS, Slater JM et al (2009) Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. J Appl Physiol 106:1935–1942

Bascove M, Touche N, Frippiat JP (2008) *Pleurodeles waltl* humoral immune response under spaceflight conditions. J Gravit Physiol 15:151–152

Bascove M, Huin-Schohn C, Gueguinou N et al (2009) Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. FASEB J 23:1607–1615

Belay T, Aviles H, Vance M et al (2002) Effects of the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions on resistance of mice to infection with *Klebsiella pneumoniae*. J Allergy Clin Immunol 110:262–268

Ben ND, Padgett DA, Loria RM et al (1999) Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity. J Med Microbiol 48:425–431

Burikhanov RB, Wakame K, Igarashi Y et al (2000) Suppressive effect of active hexose correlated compound (AHCC) on thymic apoptosis induced by dexamethasone in the rat. Endocr Regul 34:181–188

Cancro MP, Hao Y, Scholz JL et al (2009) B cells and aging: molecules and mechanisms. Trends Immunol 30:313–318

Cogoli A, Tschopp A, Fuchs-Bislin P (1984) Cell sensitivity to gravity. Science 225:228–230

Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF (2008) Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. Aviat Space Environ Med 79:835–843

Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB et al (1993) Altered regulation of IL-6 production with normal aging: possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivate. J Immunol 150:5219–5230

Du C, Guan Q, Khalil MW et al (2001) Stimulation of TH2 response by high doses of dehydroepiandrosterone in KLH-primed splenocytes. Exp Biol Med 226:1051–1060

Fleming SD, Edelman LS, Chapes SK (1991) Effects of corticosterone and microgravity on inflammatory cell production of superoxide. J Leukoc Biol 50:69–76

Gil A (2002) Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. Eur J Clin Nutr 56:S1–S4

Glaser R, Sheridan J, Malarkey WB et al (2000) Chronic stress modulates the immune response to a pneumococcal pneumonia vaccine. Psychosom Med 62:804–807

Glaser R, Kiecolt-Glaser JK (2005) Stress-induced immune dysfunction: implications for health. Nat Rev Immunol 5:243–251

Gridley DS, Nelson GA, Peters LL et al (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. II. Activation, cytokines, erythrocytes, and platelets. J Appl Physiol 94:2095–2103

Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M et al (2009) Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? J Leuk Biol 86:1027–1038

Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M et al (2010). The immune system under altered gravity conditions. J Gravit Physiol in press

Hales NW, Yamauchi K, Alicea A et al (2002) A countermeasure to ameliorate immune dysfunction in in vitro simulated microgravity environment: role of cellularnucleotide nutrition. In Vitro Cell Dev Biol Anim 38:213–217

Hazeldine J, Arlt W, Lord JM (2010) Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function. J Steroid Biochem Mol Biol 120:127–136

Hirose A, Sato E, Fujii H et al (2007) The influence of active hexose correlated compound (AHCC) on cisplatin-evoked chemotherapeutic and side effects in tumor-bearing mice. Toxicol Appl Pharmacol 222:152–158

Holen E, Bjørge OA, Jonsson R (2006) Dietary nucleotides and human immune cells. II. Modulation of PBMC growth and cytokine secretion. Nutr 22:90–96

Inserra P, Zhang Z, Ardestani SK et al (1998) Modulation of cytokine production by dehydroepiandrosterone (DHEA) plus melatonin (MLT) supplementation of old mice. Proc Soc Exp Biol Med 218:76–82

Kalimi M, Regelson M (1990) The biologic role of dehydroepiandrosterone (DHEA). Walter de Gruyter, New York

Kennedy AR, Ware JH, Guan J et al (2004) Selenomethionine protects against adverse biological effects induced by space radiation. Free Radic Biol Med 36:259–266

Kennedy AR, Guan J, Ware JH (2007) Countermeasures against space radiation induced oxidative stress in mice. Radiat Environ Biophys 46:201–203

Knoferl MW, Angele MK, Catania RA et al (2003) Immunostimulatory effects of dehydroepiandrosterone in proestrus female mice after trauma-hemorrhage. J Appl Physiol 95:529–535

Konstantinova IV, Rykova MP, Lesnyak AT et al (1993) Immune changes during long-duration missions. J Leukoc Biol 54:189–201

Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL et al (1999) DHEA and DHEA-S: a review. J Clin Pharmacol 39:327–348

Kulkarni AD, Yamauchi K, Hales NW et al (2002) Nutrition beyond nutrition: plausibility of immunotrophic nutrition for space travel. Clin Nutr 21:231–238

Kulkarni AD, Yamauchi K, Sundaresan A et al (2005) Countermeasure for space flight effects on immune system: nutritional nucleotides. Gravit Space Biol Bull 18:101–102

Maldonado J, Navarro J, Narbona E et al (2001) The influence of dietary nucleotides on humoral and cell immunity in the neonate and lactating infant. Early Hum Dev 65:S69–S74

Matsui Y, Uhara J, Satoi S et al (2002) Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study. J Hepatol 37:78–86

Morey-Holton ER, Globus RK (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. J Appl Physiol 92:1367–1377

Nagafuchi S, Katayanagi T, Nakagawa E et al (1997) Effects of dietary nucleotides on serum antibody and splenic cytokine production in mice. Nutr Res 17:1163–1174

Navarro J, Ruiz-Bravo A, Jiménez-Valera M et al (1996) Modulation of antibody-forming cell and mitogen-driven lymphoproliferative responses by dietary nucleotides in mice. Immunol Lett 53:141–145

Nogusa S, Gerbino J, Ritz BW (2009) Low-dose supplementation with active hexose correlated compound improves the immune response to acute influenza infection in C57BL/6 mice. Nutr Res 29:139–143

Powell JM, Sonnenfeld G (2006) The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on in vitro spleen cell proliferation and cytokine production. J Interferon Cytokine Res 26:34–49

Radford DJ, Wang K, McNelis JC et al (2010) Dehdyroepiandrosterone sulfate directly activates protein kinase C-beta to increase human neutrophil superoxide generation. Mol Endocrinol 24:813–821

Rykova MP, Antropova EN, Larina IM et al (2008) Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. Acta Astraunautica 63:697–705

Smith SM, Zwart SR (2008) Nutrition issues for space exploration. Acta Astronaut 63:609–613

Stein TP, Leskiw MJ (2000) Oxidant damage during and after spaceflight. Am J Physiol Endocrinol Metab 278:E375–E382

Straub RH, Konecna L, Hrach S et al (1998) Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man *in vitro*: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. J Clin Endocrinol Metab 83:2012–2017

Wambi C, Sanzari J, Wan XS et al (2008) Dietary antioxidants protect hematopoietic cells and improve animal survival after total-body irradiation. Radiat Res 169:384–396

Wambi CO, Sanzari JK, Sayers CM et al (2009) Protective effects of dietary antioxidants on proton total-body irradiation-mediated hematopoietic cell and animal survival. Radiat Res 172: 175–186

Wan XS, Bloch P, Ware JH et al (2005) Detection of oxidative stress induced by low- and high-linear energy transfer radiation in cultured human epithelial cells. Radiat Res 163:364–368

Wang S, Welte T, Fang H et al (2009) Oral administration of active hexose correlated compound enhances host resistance to West Nile encephalitis in mice. J Nutr 139:598–602

Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B (2009) The aging of the immune system. Transpl Int 22:1041–1050

Yagita A, Maruyama S, Wakasugi S et al (2002) H-2 haplotype-dependent serum IL-12 production in tumor-bearing mice treated with various mycelial extracts. In Vivo 16:49–54

Yamauchi K, Hales NW, Robinson SM et al (2002) Dietary nucleotides prevent decrease in cellular immunity in ground-based microgravity analog. J Appl Physiol 93:161–166

Zhang Z, Araghi-Niknam M, Liang B et al (1999) Prevention of immune dysfunction and vitamin E loss by dehydroepiandrosterone and melatonin supplementation during murine retrovirus infection. Immunology 96:291–297

CONCLUSION

Les vols spatiaux sont source de nombreux stress à l'origine de dérèglements physiologiques, notamment au niveau du système immunitaire. Nous avons écrit une revue de la littérature concernant les effets des vols spatiaux sur le système immunitaire (publication 1). De nombreuses études montré que suite à un vol spatial, les organes lymphoïdes ont souvent une taille réduite (Durnova *et al.*, 1976 ; Gridley *et al.*, 2003 ; Baqai *et al.*, 2009), que les cellules de l'immunité innée sont affectées (diminution de l'activité des phagocytes par exemple, (Kaur *et al.*, 2005 ; 2008)), qu'il y a une diminution de l'activité des cellules NK (Rykova *et al.*, 1992 ; Konstantinova *et al.*, 1995) ou encore que le nombre de cellules souches myéloïdes est diminué (Ichiki *et al.*, 1996). Les cellules de l'immunité adaptative sont également affectées. Par exemple, il existe une inhibition sévère de l'activation des lymphocytes T (Cogoli *et al.*, 1984 ; Nash & Mastro, 1992 ; Sonnenfeld *et al.*, 1998 ; Gridley *et al.*, 2009). Ces diverses observations sont à mettre en parallèle avec la réactivation de virus latents (Stowe *et al.*, 2001 ; Cohrs *et al.*, 2008) et l'augmentation de la croissance et de la virulence microbienne dans les conditions de vol spatial (Taylor, 1974 ; Hammond *et al.*, 2000 ; Kinney *et al.*, 2000 ; Nickerson *et al.*, 2000 ; Belay *et al.*, 2003 ; Chopra *et al.*, 2006).

Les études décrites ci-dessus ont porté sur les altérations du système immunitaire inné ou à médiation cellulaire suite à un vol spatial. A ce jour, très peu d'études ont été menées sur l'immunité humorale et la production d'anticorps. C'est donc sur ce thème que travaille le laboratoire « Développement et Immunogénétique ». Par le passé, les travaux menés par ce laboratoire ont montré que l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl* utilise un mécanisme de recombinaison V(D)J, pour fabriquer ses gènes fonctionnels d'anticorps, similaire à celui utilisé par l'homme (Frippiat *et al.*, 2001). De plus, les 3 isotypes d'anticorps présents chez le pleurodèle ont leur équivalent chez l'homme (Schaerlinger *et al.*, 2008) et le développement précoce de cet animal se fait de manière autonaume. *P. waltl* est donc un bon modèle pour étudier les effets des vols spatiaux sur le système immunitaire humoral. Ainsi, en 1999, le laboratoire a effectué l'expérience Genesis, qui a consisté à immuniser des pleurodèles adultes durant 5 mois à bord de la station spatiale Mir. Il a tout d'abord été mis en évidence une augmentation des IgY chez cet animal suite au vol (Boxio *et al.*, 2005). Puis, l'étude de l'utilisation des familles de segments VH pour la fabrication des chaînes lourdes d'IgM a montré que les familles VHII et VHVI sont majoritairement utilisées en réponse à une stimulation antigénique (présentes dans environ 85% des chaînes lourdes d'IgM). Il a aussi été constaté une inversion de l'utilisation de ces 2 familles dans les chaînes lourdes d'IgM selon que l'immunisation a eu lieu à bord de Mir ou sur Terre (VHII dans 27,7% des chaînes

lourdes d'IgM sur Terre et 61,2% dans Mir ; VHVI dans 58,4% des chaînes lourdes d'IgM sur Terre et 24,1% dans Mir, **fig. 18**). Nous avons ensuite étudié l'utilisation de ces segments VH au sein des familles VHII et VHVI (publication 2). Nos travaux ont montré qu'un seul segment de la famille VHII est utilisé en vol ou au sol. En revanche, des 4 segments VHVI utilisés lors de l'immunisation sur Terre, seuls 2 sont utilisés dans Mir, expliquant la diminution de plus de la moitié de l'utilisation de cette famille pour la fabrication de chaînes lourdes d'IgM dans Mir.

Sur ces mêmes animaux, nous avons montré que le mécanisme introduisant les hypermutations somatiques, nécessaires à l'augmentation de l'affinité des anticorps envers leur antigène, est également modifié lorsque l'immunisation a lieu en vol (publication 3). En effet, nous avons constaté, sur l'unique segment VHII utilisé lors de la synthèse des chaînes lourdes d'IgM en réponse à l'immunisation que les hypermutations somatiques sont diminuées de moitié lorsque les animaux sont immunisés dans Mir. Cette observation suggère une moins bonne maturation de l'affinité des anticorps et donc une moins bonne efficacité de la réponse humorale lors d'un vol spatial. Nous pensons que cette diminution de la fréquence des hypermutations somatiques n'est pas due à l'absence d'un des facteurs impliqués dans ce processus puisque ceux-ci ont tous été identifiés chez les mammifères et chez les poissons osseux. Donc, il est très fortement probable qu'ils soient également présents chez *P. waltl*.

Suite aux travaux menés sur l'amphibien adulte, nous avons étudié l'impact d'un vol spatial sur la synthèse du répertoire primaire d'anticorps (IgM). Pour cela, nous avons effectué l'expérience AMPHIBODY (larves de pleurodèle dont la synthèse des premières chaînes lourdes d'IgM a eu lieu durant un séjour de 10 jours à bord de l'ISS, publication 4). Nous avons ainsi pu constater une augmentation des transcrits codant les chaînes lourdes des IgM le jour de l'atterrissage. Cette augmentation est réversible car 25 jours plus tard, plus aucune différence n'est constatée. Les stress subi lors du vol ont été recréés afin de savoir le(s)quel(s) étai(en)t responsable(s) de la modification observée. Nous avons ainsi pu montrer que seules les modifications de la gravité modifient l'expression des IgM. Nous avons aussi montré que la lymphopoïèse précoce ainsi que le développement des lymphocytes T n'étaient pas alterés lorsque la gravité est changée. Par contre, le développement des lymphocytes B pourrait être affecté car nous avons observé des modifications de l'expression de plusieurs membres de la famille NFkB qui vont dans le même sens que les modifications d'expression des IgM lorsque la gravité est modifiée.

En parallèle à ces travaux, nous avons caractérisé la DNA polymérase mu (Polμ) de *P. waltl* et avons quantifié par PCR quantitative en temps réel l'expression de son transcrit au cours du développement ainsi que dans divers organes d'adulte. Nous avons terminé cette étude en quantifiant ce transcrit dans des larves soumises à différents stress rencontrés lors d'un vol spatial. Deux isoformes de la Polμ ont été identifiées chez *P. waltl*, l'isoforme majoritaire étant la forme entière qui code la protéine fonctionnelle, ce qui diffère des autres espèces. Son expression est forte au début du développement, ainsi que dans les organes génitaux de l'adulte, ce qui lui permet de protéger le génome des cassures double-brin et ainsi d'assurer le bon développement précoce de l'animal. Son expression est également importante dans les organes lymphoïdes primaires car elle participe à la recombinaison V(D)J. Contrairement aux radiations, une modification de la gravité n'influence pas la transcription de la Polμ chez les larves de *P. waltl*.

Nous avons effectué un travail similaire sur la molécule C3 du complément chez *P. waltl*. Nous avons caractérisé l'ADNc codant cette protéine, puis l'avons quantifié par PCR quantitative en temps réel durant le développement précoce du pleurodèle ainsi que dans différents organes chez l'adulte. L'expression de ce transcrit s'intensifie nettement dès le début de la mise en place du tube digestif chez la larve (stade du bourgeon caudal). Chez l'adulte, le foie exprime très majoritairement ce transcrit. Un vol spatial ou l'hypergravité n'influence pas la transcription de C3. En revanche, la microgravité simulée ou encore d'autres stress tels que les radiations, le confinement, le choc thermique ou encore les vibrations modulent l'expression de C3. Certaines études ont pu mettre en évidence l'influence complexe des facteurs environnementaux (type et intensité du stress, etc) sur l'expression de C3. Dans notre étude, certains des stress associés à un vol spatial augmentent la transcription de cette molécule (microgravité simulée, choc thermique) alors que d'autres la diminuent (radiations, confinement). La combinaison de ces stress lors d'un vol ne permet donc pas d'observer de différence dans la transcription de la molécule C3. Nous avons terminé notre étude en quantifiant le transcrit C3 dans le foie de souris soumises à deux niveaux d'hypergravité ou à une suspension anti-orthostatique et n'avons constaté aucune modification de l'expression des transcrits C3 dans ces échantillons.

Enfin, nous avons étudié l'impact de 21 jours d'hypergravité à 2 ou 3G sur le système immunitaire de jeunes souris adultes (publication 5). Nous avons mis en évidence, par des tests physiologiques et comportementaux, une absence de réaction au stress chez les souris soumises à 2G, associé à des modifications du système immunitaire. En revanche, à 3G, une réponse au stress a été mise en évidence, associé à d'autres types de modifications du système immunitaire. Cela montre l'influence de la gravité, associée ou non à une réponse au stress, sur le système immunitaire murin.

Le but de tous ces travaux était de déterminer les effets des stress associés aux vols spatiaux sur le système immunitaire dans l'espoir de trouver des stratégies permettant de contrecarrer leurs effets. C'est pourquoi nous avons également écrit un chapitre de livre qui décrit les effets bénéfiques de quelques mesures pharmacologiques (antioxidants, nucléotides, AHCC, DHEA) qui peuvent être utilisées pour contrecarrer les effets de ces stress sur le système immunitaire. Ces mesures doivent encore être améliorées mais pourraient à terme avoir un intérêt non seulement pour les astronautes, mais aussi pour toutes les personnes dont le système est affaibli sur Terre.

PERSPECTIVES

L'ensemble de ces travaux ouvre plusieurs perspectives dont voici trois exemples :

1. Effets d'un changement de la gravité sur la création du répertoire primaire d'anticorps

Comme indiqué dans cette thèse, l'assemblage des segments V, (D), et J afin de créer des gènes d'anticorps fonctionnels est possible grâce au processus de recombinaison V(D)J. Ce processus est à l'origine de la diversité du répertoire primaire d'anticorps et requiert l'expression d'effecteurs spécifiques (RAG1 et 2) ainsi que l'ouverture de la chromatine (Schatz & Ji, 2011). Or, des changements d'expression des gènes d'anticorps ont été observés après un vol spatial (Boxio *et al.,* 2005 ; Bascove *et al.*, 2009). De plus, les travaux du laboratoire indiquent qu'un changement de gravité au cours du développement de *P. waltl* affecte la quantité d'ARNm de chaînes lourdes d'IgM (publication 4). Il est donc possible que la machinerie de recombinaison V(D)J soit affectée par une modification de la gravité.

Pour tester cette hypothèse, il est envisagé d'extraire l'ARN de larves de pleurodèles qui se sont développées en microgravité, en hypergravité ou en microgravité simulée dans une RPM, afin d'étudier les associations entre les segments VH, D et JH car une modification de ces associations révèlerait une différence d'activité de la machinerie de recombinaison V(D)J. Ce travail pourra être réalisé par PCR avec des amorces spécifiques des différentes familles de gènes VH ou des segments JH. Nous pourrions également quantifier les transcrits de RAG1 et RAG2 par RT-PCR quantitative en temps réel ainsi que les protéines correspondantes par la technique de western blotting (ceci nécessitera de trouver des anticorps anti-RAG1 et RAG2 présentant une réaction croisée avec les protéines RAG1 et 2 du pleurodèle).

A moyen terme, nous réaliserons des travaux similaires sur des souriceaux développés en hypergravité. Dans le cadre du groupe 'CNES-Développement', il est donc envisagé de faire s'accoupler des souris C57BL/6 de façon à ce que tout le développement *in utero* ait lieu durant le séjour en hypergravité. Les souriceaux seront sacrifiés à la naissance et les différents isotypes d'anticorps quantifiés par RT-PCR quantitative en temps réel dans les rates. L'étude portera aussi sur l'expression des effecteurs RAG1 et RAG2 du processus de recombinaison V(D)J dans le thymus et la moelle osseuse. Les associations entre les segments géniques VH, D et JH seront étudiées de la même façon que chez *P. waltl*. Ainsi, nous saurons si la création du répertoire primaire d'anticorps murin est affectée par l'augmentation de la gravité. L'impact des modifications observées au niveau des produits de recombinaison sera évalué

grâce au système des structures canoniques permettant de prédire les structures des boucles peptidiques formant le site de liaison d'un anticorps. Le laboratoire a déjà déterminé ces structures pour les domaines VH de *P. waltl* (données non publiées). Celles de la souris sont décrites dans la littérature.

Si ces expériences démontrent que le processus de recombinaison V(D)J est affecté par un changement de la gravité, le laboratoire cherchera pourquoi en étudiant :

- le niveau de méthylation de l'ADN car il a été montré que l'ADN qui recombine est hypométhylé (Goldmit & Bergman, 2004).
- l'expression de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, notamment du système NHEJ car beaucoup d'entre-elles sont impliquées dans le processus de recombinaison V(D)J (Schatz & Ji, 2011).
- l'expression de Pax5 car il faciliterait le recrutement de RAG aux segments géniques VH (Zhang *et al.,* 2006).
- enfin, le niveau d'acétylation des histones car celui-ci indique que la chromatine est ouverte (McBlane & Boyes, 2000).

2. <u>Maturation de l'affinité des anticorps en gravité modifiée</u>

Nous avons démontré qu'il y a moins d'hypermutations somatiques dans les anticorps de *P. waltl* immunisés en micropesanteur par rapport aux contrôles immunisés au sol (publication 3). Or, ces hypermutations sont très importantes car elles permettent aux lymphocytes B d'améliorer les sites de liaison de leurs anticorps et donc d'augmenter l'affinité des anticorps. A l'avenir, il faudra déterminer si des souris soumises à l'hypergravité ou à une suspension anti-orthostatique présentent aussi une modification de ce processus.

Pour répondre à cette question, il est envisagé d'utiliser des antigènes qui induisent la synthèse d'anticorps dont on sait à partir de quels segments VH et VL ils sont fabriqués. Il sera utilisé des groupes de 10 à 12 souris pour ces expériences car ce nombre est suffisant pour permettre l'analyse statistique des données immunologiques. Des souris soumises pendant 21 jours à ces conditions de stress seront immunisées. Cette durée de 21 jours nous permettra de comparer nos résultats avec les données que nous avons obtenues (publication 5). A la fin des 21 jours, les souris seront sacrifiées. Les différents isotypes d'anticorps et les anticorps spécifiques seront dosés dans le sérum et leur spécificité et affinité étudiées. Le nombre de plasmocytes se trouvant dans la rate sera déterminé par cytométrie en

flux. L'ADN des plaques de Peyer et de la rate sera extrait afin d'amplifier les associations VH-D-JH exprimées. Les séquences de ces réarrangements seront alignées avec la séquence du gène VH correspondant non réarrangé afin de détecter les hypermutations somatiques et de calculer leurs fréquences. Cette étude nous indiquera si la fréquence de ces hypermutations somatiques et la qualité des anticorps sont affectées par les stress gravitaires testés. Ces recherches sont donc complémentaires de celles présentées dans publication 4.

3. Effets de stress gravitaires sur les lymphocytes de la rate

Les résultats acquis durant cette thèse montrent que la production de cytokines Th1, d'IgG, ainsi que la réponse prolifératives des lymphocytes B et T sont modifiées chez des souris exposées à différents niveaux d'hypergravité. En revanche, la production d'IgA et d'IgM n'est pas affectée (publication 5). Afin de comprendre quels mécanismes sont responsables de ces modifications, il est prévu d'étudier les lymphocytes de la rate de souris C57BL/6 soumises à des changements de gravité pendant 21 jours (hypergravité ou suspension anti-orthostatique).

Plusieurs études suggèrent que des changements de la gravité pourraient affecter les différentes populations de cellules immunitaires contenues dans les organes et tissus lymphoïdes (Sonnenfeld *et al.*, 1992 ; Gridley *et al.*, 2003 ; Wei *et al.*, 2003 ; O'Donnell *et al.*, 2009). Il sera donc intéressant de déterminer par cytométrie en flux s'il y a des modifications de la répartition des lymphocytes (lymphocytes B et T, notamment les cellules Th1, Th2, Th17 et Treg) dans la rate de ces souris.

Il se pourrait aussi que ce soit l'activation des lymphocytes B qui soit affectée par un changement de la gravité comme c'est le cas pour les lymphocytes T (Cogoli *et al.*, 1984). On sait que l'activité des lymphocytes B est influencée par les cytokines produites par les cellules dendritiques et les lymphocytes T, et par les cytokines de type Th2 qui favorisent la production d'anticorps. Il sera donc judicieux de quantifier les cytokines intracellulaires et sécrétées par différentes approches (RT-PCR quantitative en temps réel, ELISA ou cytométrie en flux) afin de savoir s'il y a une augmentation de la production des cytokines Th2, comme cela a été suggéré après un vol spatial (Crucian *et al.*, 2008), et/ou des cytokines induisant la commutation de classe vers l'isotype IgG.

Enfin, dans un futur proche, il est prévu de purifier les lymphocytes B de la rate de ces souris, par sélection négative avec un système de billes magnétiques tels que ceux vendus par la société Miltenyi Biotec, pour pouvoir ensuite analyser le transcriptome contenu dans ces lymphocytes B. Cette étude permettra de savoir comment les stress cités ci-dessus affectent l'expression génique car il se pourrait que les lymphocytes B répondent moins bien aux mitogènes suite à une modification de l'expression de gènes impliqués dans la signalisation, l'initiation et/ou le maintien de l'activité des lymphocytes B.

ANNEXES

Annexe 1

Séquences nucléotidique et peptidique de C3 chez *P. waltl*

Ci-après est présentée la séquence nucléotidique (4914 bases) et peptidique (1638 acides aminés) de C3 chez *P. waltl*. En grisé sont les séquences des différents domaines schématisés dans la figure 26. Le codon initiateur de la traduction ainsi que le codon stop sont surlignés en vert. Les amorces du tableau 3 sont indiquées par des flèches sur la séquence. Les motifs indispensables à la fonction de la protéine (motif de clivage par une C3 convertase, motif de liaison thioester avec la membrane de la cellule-cible, etc.) sont surlignés en rouge.

```
                                                                GACACTGCCCTCCAGACGGCAGC
ATG GAG GGA AAG GCG TTT CTC CTG CTC CTG CTT CAG CTC TGC CTG ACT TCC GTG GTG
 M   E   G   K   A   F   L   L   L   L   L   Q   L   C   L   T   S   V   V

CAC AGT CAG TCA CAA TGT ATA ATG ATC ACT CCC AAT GTC CTG CGG GTG GAG AAC TTC
 H   S   Q   S   Q   C   I   M   I   T   P   N   V   L   R   V   E   N   F

GAG ACA GTT GTC GTT GAA TTA CAC AAT CAA AAC AGC CCC ATT AAT GTT GAA GTG TCT
 E   T   V   V   V   E   L   H   N   Q   N   S   P   I   N   V   E   V   S

GTG TAC GAC TTT CCA CAG AAG AGG AGG AAT CTT TTC TCT ACA AAC ATC GCT CTC AAC
 V   Y   D   F   P   Q   K   R   R   N   L   F   S   T   N   I   A   L   N

GGA GAC AAT GGT TAC CAG GGG AAG TCA GAG ATA ATG GTT CCT GCC AAA GAC ATG AAG
 G   D   N   G   Y   Q   G   K   S   E   I   M   V   P   A   K   D   M   K

GAT GAT TCC AAA CTC AAA CAG TAT GTG TAT GTT GTC GCC AAA TCT GCT GGG TGC CAA
 D   D   S   K   L   K   Q   Y   V   Y   V   V   A   K   S   A   G   C   Q

GTG GAG AAA GTG GTC CTC GTT TCC TTT CAG AGT GGA TAC ATA TTT ATA CAG GCC GAT
 V   E   K   V   V   L   V   S   F   Q   S   G   Y   I   F   I   Q   A   D

AAA ACC ATC TAT ACA CCT GGC TCT ACA GTG TAT TAT CGA TTG TTC ACC ATG GGT GGC
 K   T   I   Y   T   P   G   S   T   V   Y   Y   R   L   F   T   M   G   G

AAA CTT CAA CCT GTC AGC CGA ACA GTC ATT GTT GAA CTT GAG ACA CCG GAA GGC ATC
 K   L   Q   P   V   S   R   T   V   I   V   E   L   E   T   P   E   G   I

ATT GTG AAG CGA GAC CTG ATT GAT CAT ACT GGT CCT AAC AGC GGT GGC GGC ATA TTG
 I   V   K   R   D   L   I   D   H   T   G   P   N   S   G   G   G   I   L

TCA CAG TCC CAC AAA TTG CCT GAA ATA ATC AAC CTG GGG ACC TGG ACA ATT ATA GCC
 S   Q   S   H   K   L   P   E   I   I   N   L   G   T   W   T   I   I   A

CGG TTT GAG GAT TCA CCT CTG CAG AAT TAC ACC ACA CAG TTT GAT GTA AAA GAG TAC
 R   F   E   D   S   P   L   Q   N   Y   T   T   Q   F   D   V   K   E   Y

GTG CTG CCC AGT TTT GAA GTT TCC ATA AAA CCA AGG ATT CCC TTC TTC TAT GTC AGT
 V   L   P   S   F   E   V   S   I   K   P   R   I   P   F   F   Y   V   S

GGT GAT GAA GTG TGG GTG GAC ATC ACA GCA AGG TAT CTG TAT GGG AGG CCA GTA GAG
 G   D   E   V   W   V   D   I   T   A   R   Y   L   Y   G   R   P   V   E

GGT GAT GCC TTT GTT GTT TTT GGA GTA AAG TTT GAT GAT GAA AAG AAA AGC ATG CCA
 G   D   A   F   V   V   F   G   V   K   F   D   D   E   K   K   S   M   P

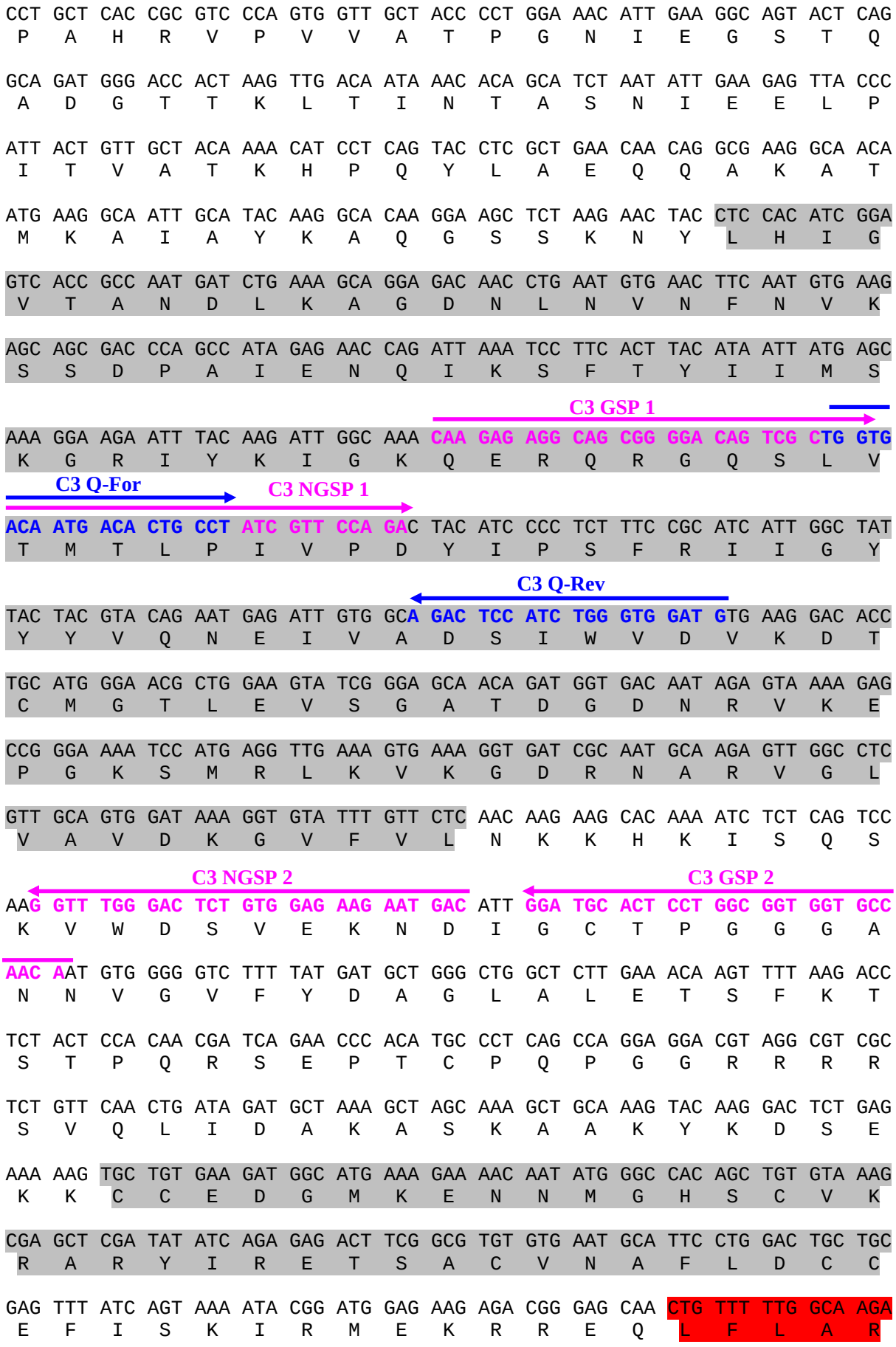
TCA TCC CTT CAA AGA ATC GAG ATA TCT GAA GGC AGC GGA GAA GCA AAA CTG ACC AGA
 S   S   L   Q   R   I   E   I   S   E   G   S   G   E   A   K   L   T   R

CAG ATG TTG ATG GAT AGT TTT AAA GAC ATT AAT GAA CTC ATC GAT CGC AGC ATC TAT
 Q   M   L   M   D   S   F   K   D   I   N   E   L   I   D   R   S   I   Y

GTT TCT GTA ACT GTC TTA ACA GCA GCG GGA AGT GAC ATG GTG GAG GCT GAG TTC AGT
 V   S   V   T   V   L   T   A   A   G   S   D   M   V   E   A   E   F   S

GAC ATT CGT ATC GTA ACG TCA CCG TAT AAA ATC CTC TTC ACC AAA ACA CCC AAA TAC
 D   I   R   I   V   T   S   P   Y   K   I   L   F   T   K   T   P   K   Y

      C3 For
TTC AAG CCT GGA ATG CCC TTT GAA CTT ATG GTC TTC GTT ACA AAC CCT GAC GGC TCT
 F   K   P   G   M   P   F   E   L   M   V   F   V   T   N   P   D   G   S
```


C3 GSP 1
C3 Q-For
C3 NGSP 1
C3 Q-Rev
C3 NGSP 2
C3 GSP 2

AGC GAA GTT GAA GAA GGA TAC CTA TCC GAT GAA GAT ATC ACC TCC AGG ACT GAG TTT
 S   E   V   E   E   G   Y   L   S   D   E   D   I   T   S   R   T   E   F

CCA GAG AGC TGG TTC TGG AAA GTG GAA CTG CTG GAT GGA CCT CCA GAT GCG AAT GGA
 P   E   S   W   F   W   K   V   E   L   L   D   G   P   P   D   A   N   G



CTC TCA AGT AAA ACA CTG CAA ATG TTC CTG AAA GAT TCC ATC ACC ACC TGG GAA GTT
 L   S   S   K   T   L   Q   M   F   L   K   D   S   I   T   T   W   E   V

CTT GCT GTC AGC CTC TCA GAC GGA AAG GGG ATC TGT GTG GCT GAT CCA TAT GAA ATC
 L   A   V   S   L   S   D   G   K   G   I   C   V   A   D   P   Y   E   I

ACT GTG TTC AAG AAG TAC TTT ATT GAC CTG CGC CTA CCT TAC TCT GTG GTC AGG AAT
 T   V   F   K   K   Y   F   I   D   L   R   L   P   Y   S   V   V   R   N

GAA CAG GTG GAA ATC CGA GCT GTG CTT TAT AAC TAT GAG GAC GAC CAC GAT GAA ATA
 E   Q   V   E   I   R   A   V   L   Y   N   Y   E   D   D   H   D   E   I

ACG GTT AAA GTC GAG CTT TTG TAC AAT GAA AAA TTC TGC AGC GCT TCC ACT TCA AAG
 T   V   K   V   E   L   L   Y   N   E   K   F   C   S   A   S   T   S   K

AAG AGA TTC CGT CAG GAA GTG AAG ATG ACA GGC AAA TCT TCC CGT GCT GTG TCC TTC
 K   R   F   R   Q   E   V   K   M   T   G   K   S   S   R   A   V   S   F

ATC ATT GTG CCC TTG GAG GCA GGC CTG ATT GAC ATT GAG GTG AAG GCT TAT TTT CCA
 I   I   V   P   L   E   A   G   L   I   D   I   E   V   K   A   Y   F   P

AAC TAC ATT GGT GAC GGA GTA AAG AAG AAG CTA AAA GTT GTG CCC GAA GGA ATG AAA
 N   Y   I   G   D   G   V   K   K   K   L   K   V   V   P   E   G   M   K

ATT AGC AAA ACA GTC ACA GTG GTG ACC TTG GAT CCA GCA ACT AAA GGA AAA GAT GGT
 I   S   K   T   V   T   V   V   T   L   D   P   A   T   K   G   K   D   G

GTC CAG GAA GAG AAA ATT AAC GCT GTT GAT TTG AAG GAT ATT GTT CCA AAA AGT GAA
 V   Q   E   E   K   I   N   A   V   D   L   K   D   I   V   P   K   S   E

TCT GAG ACC ATG GTC AGC ATC CAA GGA ACC CCC ATC ACA CAG CTG ATC GAG AAA TCC
 S   E   T   M   V   S   I   Q   G   T   P   I   T   Q   L   I   E   K   S

ATT GAT GGG TCA AAT CTT GGG CAT CTT ATT GTT GTG CCG CGG GGC TGC GGG GAG CAG
 I   D   G   S   N   L   G   H   L   I   V   V   P   R   G   C   G   E   Q

AAC ATG ATG TCA TTG ACT CCA GTA GTT ATT GCA ACA CAT TTT CTG GAC AAC ACC GGA
 N   M   M   S   L   T   P   V   V   I   A   T   H   F   L   D   N   T   G

CAG TGG GAG ACC TTA GGA GTG AAC CGT AGA GCT GAA GCC ATC AAG AAC ATT AAT CAG
 Q   W   E   T   L   G   V   N   R   R   A   E   A   I   K   N   I   N   Q

GGT TAC ACA CAG CAG TTG GCT TAC CGT CAA GGT GAC TCT TCT TAT GCT GCC TGG ACA
 G   Y   T   Q   Q   L   A   Y   R   Q   G   D   S   S   Y   A   A   W   T

AAC CGG CCT GGA AGT ACC TGG CTA ACT GCC TAC GTG GTC AAG ATT TTC GCC ATG GCT
 N   R   P   G   S   T   W   L   T   A   Y   V   V   K   I   F   A   M   A

GAC AAC CTC ATC AGC ATT CAG AAG GAC GTG ATC TGC GGC TCC GTG AAG TGG CTT GTC
 D   N   L   I   S   I   Q   K   D   V   I   C   G   S   V   K   W   L   V

TTG AAC AAG CAG AAG CCA GAT GGT ATT TTC AAG GAG GAC CAA GCT GTG ATA CAT GGA
 L   N   K   Q   K   P   D   G   I   F   K   E   D   Q   A   V   I   H   G

```
GAG ATG GTG GGT GGT ACC AGT GGA AAT GAA CCT GAC GAA TCT CTT ACT GCA TTT GTA
 E   M   V   G   G   T   S   G   N   E   P   D   E   S   L   T   A   F   V

CTC ATT GCC CTT GCA GAG AGC AAA GAA ATC TGT GGG GCT CAA GTG AAC AGT TTG GAA
 L   I   A   L   A   E   S   K   E   I   C   G   A   Q   V   N   S   L   E

GGA AGC ATT CAG AAA GCT TCT GAT TAC TTG TTG AAG AAA TAC CCA ACC CTT ACC ACA
 G   S   I   Q   K   A   S   D   Y   L   L   K   K   Y   P   T   L   T   T

TCC TAT GCA GTA GCT ATA ACT GCC TAT GGT TTG GCG ATG GTC AAC AAA CTT CCG GAT
 S   Y   A   V   A   I   T   A   Y   G   L   A   M   V   N   K   L   P   D

GAC AAA AAG CTC ATG GAA ATG TCA ACA GGT GGA ACC CAT TGG AAT GTA CCC AAA GAT
 D   K   K   L   M   E   M   S   T   G   G   T   H   W   N   V   P   K   D

AAG CAG TTC GCC ATT GAA GCC ACC TCA TAT GCT TTG CTT GCT CTT CTA CGG TTA AAG
 K   Q   F   A   I   E   A   T   S   Y   A   L   L   A   L   L   R   L   K

AAG TTT GAA AAG ACC AGC GGG ATC ATG CAG TGG TTG AAT GAG CAG AGG TTC TAC GGT
 K   F   E   K   T   S   G   I   M   Q   W   L   N   E   Q   R   F   Y   G

GCT GCT TGG GGA TCT ACC CAG GCA ACA GTC ATG GTG TTC CAG GCT ATG GCG CAG TAC
 A   A   W   G   S   T   Q   A   T   V   M   V   F   Q   A   M   A   Q   Y

GTG ATG GAT GCA CCA GGC CAG CAA GAA CTA AAT CTT GAA GTT TCC ATA AAG CTG CCG
 V   M   D   A   P   G   Q   Q   E   L   N   L   E   V   S   I   K   L   P

GGG CGA TCA AAA GCT ATA AGT TAC CAG ATC ACC CAT GCT AAC GCC ATG GTG TCG AGA
 G   R   S   K   A   I   S   Y   Q   I   T   H   A   N   A   M   V   S   R

AGC GAA CAG ACG AAA CTG AAC CAC GAC TTC ACG GTC GAG GCG AAG GGT GCT GGA CAA
 S   E   Q   T   K   L   N   H   D   F   T   V   E   A   K   G   A   G   Q

GGA ACG TTA ACA GTG GTA ACT GTG TAC AAT GCC ATG CTA GCA GAG AAG AAC CTC GAG
 G   T   L   T   V   V   T   V   Y   N   A   M   L   A   E   K   N   L   E

TGT AAG AAC TTT GAG TTG AAT GTG AAA GTT CAA GAG GAC CTT ATG GCT AAG AGA CCA
 C   K   N   F   E   L   N   V   K   V   Q   E   D   L   M   A   K   R   P

GAA GGT GCG CGT GCC ACA GTC CTA ATC GAA ATC TGC ATG AAG TAT CTT GGA AAA GTG
 E   G   A   R   A   T   V   L   I   E   I   C   M   K   Y   L   G   K   V

GAT TCC ACC ATG ACT ATT GTG GAC ATT TCC ATG TTG ACT GGA TTC TCC CCA GAT ATT
 D   S   T   M   T   I   V   D   I   S   M   L   T   G   F   S   P   D   I

GAT GAT CTC AGA AGG CTT TCG GAG CCA GTG GAC AGG TAC ATT TCC AAG TTT GAA ATA
 D   D   L   R   R   L   S   E   P   V   D   R   Y   I   S   K   F   E   I

AAC AAA GGC CTG TCA GAT AAA GGA AAA CTA ATC ATC TAT TTA GAT AAG GTT TCA CAC
 N   K   G   L   S   D   K   G   K   L   I   I   Y   L   D   K   V   S   H

AAG GAA AAT GAC TGT TTT TCA TTT AAA GCA CAC CAG TAT TTC CAA GTT GGT CTC ATA
 K   E   N   D   C   F   S   F   K   A   H   Q   Y   F   Q   V   G   L   I

CAG CCA GCC ACT GTC ACC GTA TAT GAT TTT TAT TCT CTA GAG AGC CGC TGT ACA CAA
 Q   P   A   T   V   T   V   Y   D   F   Y   S   L   E   S   R   C   T   Q

TTC TAT CAT CCA GAT AAG GAA AGT GGG CTT CTC AGC AAA ATC TGC CAA GGA GAC GTT
 F   Y   H   P   D   K   E   S   G   L   L   S   K   I   C   Q   G   D   V

TGC CGA TGC GCT GAA GAA AAC TGT TAT ATG CAG AAG TTG GTT GGT GAG ATC ACA GTA
 C   R   C   A   E   E   N   C   Y   M   Q   K   L   V   G   E   I   T   V
```

```
GAC AAG CGC ATT GAA GAG GCA TGT GCA CCT GGA GTT GAC TAT GTG TAC AAG GCT AAA
 D   K   R   I   E   E   A   C   A   P   G   V   D   Y   V   Y   K   A   K

CTC CTG AAA ACA GAG AGG TCA GAC GAC TAT GAC AAC TAT ATG ATA TCC GTT ACA ACA
 L   L   K   T   E   R   S   D   D   Y   D   N   Y   M   I   S   V   T   T

GTC ATA AAA GCA GGG TCG GAC GAG GCG CCC GAA GGG AAG GTT CGC AGG TTT ATC AGC
 V   I   K   A   G   S   D   E   A   P   E   G   K   V   R   R   F   I   S

CAC AAG AAA TGC AGG AAT TCC CTA AAG CTT GAA GAT GGA AAG AGC TAT CTC ATC TGG
 H   K   K   C   R   N   S   L   K   L   E   D   G   K   S   Y   L   I   W

GGT CTC AAC AGT GAT TTG TGG AGT CAG AAG GAT GTA TTC GCC TAC TAC ATT GGG AAA
 G   L   N   S   D   L   W   S   Q   K   D   V   F   A   Y   Y   I   G   K

GAC ACG TGG ATC GAG TGG TGG CCC AAG TGC AGA GGA GTG CAC CAA TGC AAA TCA TGT
 D   T   W   I   E   W   W   P   K   C   R   G   V   H   Q   C   K   S   C

GAA AAT CTG TGAGATTTTCAGAGTTCACTGAGAATGTGATGGTTTTTGGCTGCCCTAATTAACCTTACAG
 E   N   L   *
```

Annexe 2

Effets d’un vol spatial sur le système immunitaire humoral

Cette annexe contient un chapitre du rapport au COSPAR 2008 (space science research in France). Ce chapitre de livre résume les résultats fondamentaux obtenus par le laboratoire Développement et Immunogénétique ainsi que les expériences spatiales développées par le groupe (expériences Genesis en 1999 et AMPHIBODY en 2006). Cet article présente notamment l’expérience AMPHIBODY à laquelle j’ai participé durant ma thèse en étudiant l’impact des stress sur le développement du système immunitaire humoral de l’amphibien *P. waltl*, détaillé dans la publication 4 du présent manuscrit.

Effects of spaceflight on the humoral immune response

Effets des vols spatiaux sur la réponse immunitaire humorale

M. Bascove[1], N. Gueguinou[1], C. Huin-Schohn[1, 2], N. Touche[1], J.-L. Bueb[2], E. Tschirhart[2], C. Dournon[1] and J.-P. Frippiat[1]*.

1, *Nancy-Université, EA 3442, groupe Développement et Immunogénétique, Vandœuvre-lès-Nancy, France.*
2, *Université du Luxembourg, Unité de Recherche en Sciences de la Vie, Luxembourg.*
*** Contact :** *Dr J.-P. Frippiat, Nancy-Université, EA 3442, Boulevard des Aiguillettes, BP 239. F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France. Tel: +33 3 83684494. Fax: +33 3 83684196. E-mail: Jean-Pol.Frippiat@scbiol.uhp-nancy.fr*

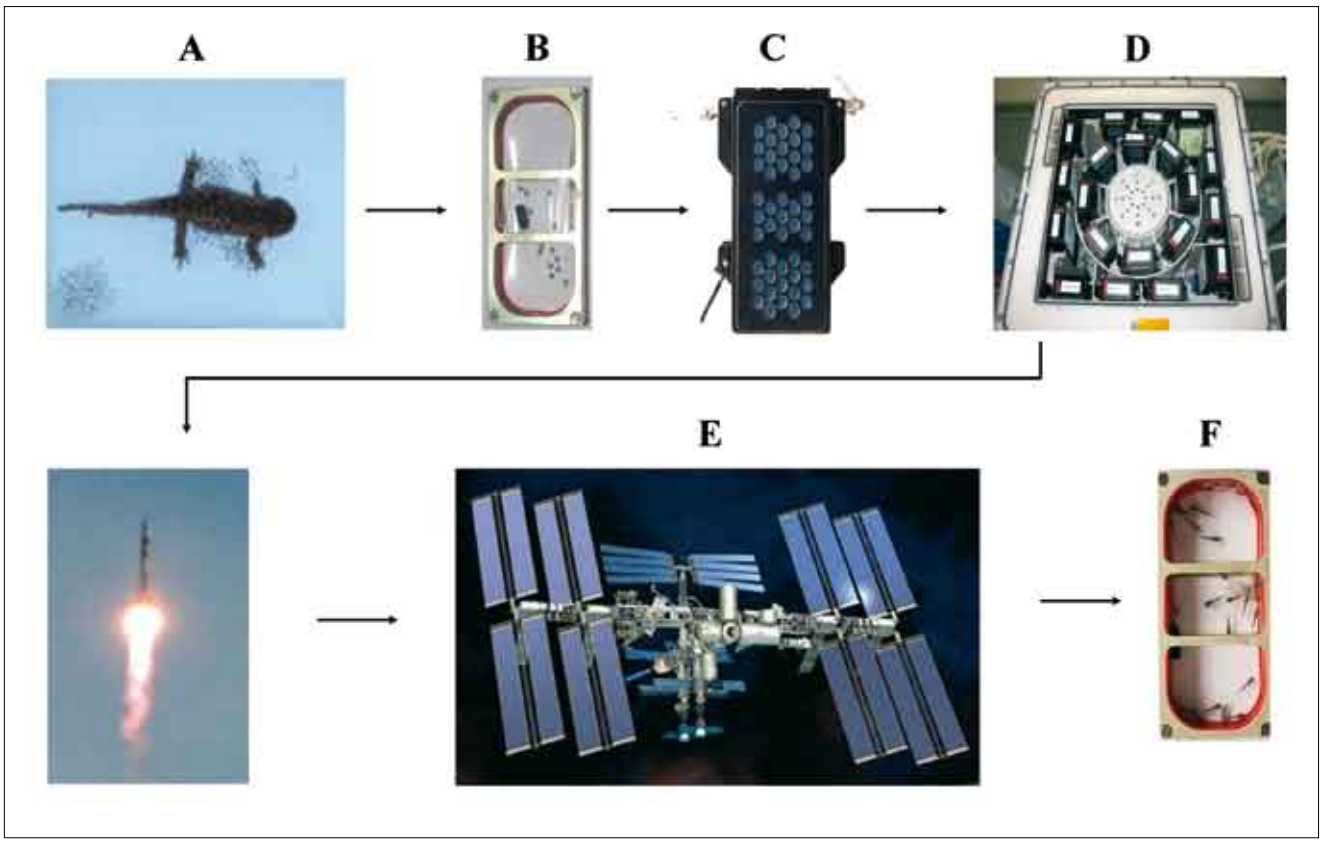
ABSTRACT

Understanding why the immune system is depressed during spaceflight is of obvious importance for future deep space missions. Using the amphibian P. waltl as a model, we showed that a long-term spaceflight affects the distribution of B lymphocytes and the humoral response. Our current objective is to determine the effects of spaceflights on the machinery which creates a highly diverse antibody repertoire required for the recognition of the numerous antigens present in the environment.

Il est important de comprendre pourquoi le système immunitaire est déprimé durant un vol spatial pour préparer les missions de longues durées. En utilisant l'amphibien P. waltl, nous avons montré qu'un séjour dans l'espace affecte la distribution des lymphocytes B et la réponse humorale. Notre objectif actuel est de déterminer les effets d'un vol sur la machinerie qui permet de créer un répertoire diversifié d'anticorps requis pour reconnaître les antigènes présents dans l'environnement.

Returning astronauts have experienced altered immune function and increased vulnerability to infection during spaceflights dating back to Apollo and Skylab missions. As plans for long-term missions continue to develop, it is imperative that we understand the effects of spaceflights on the immune system because alterations of immunity could seriously impair the ability of the host to deal with infections.

We have analyzed the effects of spaceflight on the humoral response induced by an antigenic stimulation [1]. We used the amphibian Pleurodeles waltl *(Fig. 1A)* to perform this experiment since this animal was successfully used during previous space experiments [2]. Moreover, our ground based studies indicated that it is a good model to delineate the effects of spaceflight on the humoral response. Indeed, we showed that this animal uses the same V(D)J recombination machinery than humans to produce its functional antibody genes [3]. We also showed that it possesses three isotypes of antibodies, IgM, IgY and IgP, which have their human physiological counterparts [4]. IgM are multimeric molecules as in other vertebrates and represent the most abundant isotype throughout the life of P. waltl. IgY are the physiological counterpart of mammalian IgA. IgP-expressing B cells present some similarities with mammalian B1-cells and could constitute a first line of defence for P. waltl larvae. Finally, we showed that P. waltl possesses at least 10 families of VH genes, 8 JH and 8 D segments, and that this animal uses these genes and segments in the same way as humans to create its functional antibody heavy chains genes. We also characterized antibodies produced by another amphibian, A. mexicanum, because its development is slower than the one of P. waltl. It could therefore constitute an interesting model to study key steps of the immune system ontogenesis [5]. These ground studies were also required for the analysis of the spaceflight-induced modifications of the humoral response.



(Fig.1) The Amphibody experiment. P. waltl embryos (A) were placed in miniaquaria (B) that were inserted in Type 1 containers (C). These containers were loaded in the Kubik incubator (D) and flown for 10 days (E). At landing, larvae that produce antibodies were recovered (F).

In a first attempt to determine if the humoral response of P. waltl is affected by spaceflight conditions, we performed the Genesis experiment during the Perseus mission. During this mission, adult P. waltl stayed during 5 months on board the Mir space station and were immunized [1]. We noted that 10 days after landing, the level of IgY heavy chain transcription was at least three times higher in the spleens of the animals immunized on board Mir. A modification of the distribution of IgY-producing B lymphocytes in P. waltl exposed to microgravity is likely the explanation of this observation. We also noted that the variable domains of specific IgM heavy chains are encoded by genes of the VHII and VHVI families. However, the VHII and VHVI families are found, respectively, in 28% and 58% of IgM heavy chains of animals immunized on Earth and in 61% and 24% of IgM heavy chains of animals immunized on board Mir [1]. These changes were unlikely due to an infection of the animals in the space station because they were kept in separate boxes. They rather reflected the impact of the flight on the immune response against the antigen. In conclusion, this experiment suggests that a long-term spaceflight affects the humoral response and modifies the distribution of B lymphocytes in the organism.

Our current objective is to determine if the V(D)J recombination machinery, which creates a highly diverse antibody repertoire, is altered under spaceflight conditions. To answer this question, we performed the Amphibody experiment on board the ISS from the 30th of March up to the 9th of April 2006 *(Fig.1)* . We previously showed that the first IgM heavy chain transcripts of P. waltl appear on day 5-6 after laying [3]. Therefore, if P. waltl embryos are flown before these dates, the V(D)J recombination process will occur under altered gravity conditions. From a practical point of view, 3-day-old P. waltl embryos that do not yet recombine their antibody genes and segments were flown. These embryos developed during 10 days on board the ISS. At landing, we recovered larvae which have antibodies. These larvae were sacrificed either as soon as possible after landing or 25 or 39 days later to determine if the potential modifications are reversible.

References :

[1] Boxio R., et al. (2005) J. Appl. Physiol. 98: 905-910.
[2] Dournon C. (2003) Adv. Space Biol. Med. 9:101-31.
[3] Frippiat C., et al. (2001) Immunogenetics 52: 264-275.
[4] Schaerlinger B., et al. (2008) Mol. Immunol. 45: 776-86.
[5] Schaerlinger B. & Frippiat J.-P. (2008) Dev. Comp. Immunol. 32: 908-915.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbas, A. K., Murphy, K. M. et Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* **383**, 787–793.

Aimar, C., Bautz, A., Durand, D., Membre, H., Chardard, D., Gualandris-Parisot, L., Husson, D. et Dournon, C. (2000). Microgravity and hypergravity effects on fertilization of the salamander *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian). *Biol. Reprod.* **63**, 551–558.

Aloe, L., Alleva, E. et Fiore, M. (2002). Stress and nerve growth factor: Findings in animal models and humans. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* **73**, 159–166.

An, M. I. et Choi, C. Y. (2010). Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, Scapharca broughtonii, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* **155**, 34–42.

Aoufouchi, S., Flatter, E., Dahan, A., Faili, A., Bertocci, B., Storck, S., Delbos, F., Cocea, L., Gupta, N., Weill, J. C. et Reynaud, C. A. (2000). Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3684–3693.

Arakawa, H., Moldovan, G.-L., Saribasak, H., Saribasak, N. N., Jentsch, S. et Buerstedde, J.-M. (2006). A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biology*. **4**, 1947–1956.

Atanackovic, D., Schulze, J., Kröger, H., Brunner-Weinzierl, M. C. et Deter, H. C. (2003). Acute psychological stress induces a prolonged suppression of the production of reactive oxygen species by phagocytes. *Journal of Neuroimmunology*. **142**, 159–165.

Aviles, H., Belay, T., Vance, M. et Sonnenfeld, G. (2005). Effects of space flight conditions on the function of the immune system and catecholamine production simulated in a rodent model of hindlimb unloading. *NeuroImmunoModulation.* **12**, 173–181.

Aviles, H., Belay, T., Vance, M., Sun, B. et Sonnenfeld, G. (2004). Active hexose correlated compound enhances the immune function of mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. *Journal of Applied Physiology.* **97**, 1437–1444.

Baqai, F. P., Gridley, D. S., Slater, J. M., Luo-Owen, X., Stodieck, L. S., Ferguson, V., Chapes, S. K. et Pecaut, M. J. (2009). Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *Journal of Applied Physiology.* **106**, 1935–1942.

Bardwell, P. D., Woo, C. J., Wei, K., Li, Z., Martin, A., Sack, S. Z., Parris, T., Edelmann, W. et Scharff, M. D. (2004). Altered somatic hypermutation and reduced class-switch recombination in exonuclease 1-mutant mice. *Nature Immunology.* **5**, 224–229.

Bascove, M. et Frippiat, J.-P. (2010). Molecular characterization of *Pleurodeles waltl* activation-induced cytidine deaminase. *Mol. Immunol.* **47**, 1640–1649.

Bascove, M., Guéguinou, N., Schaerlinger, B., Gauquelin-Koch, G. et Frippiat, J.-P. (2011). Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB Journal.* **25**, 2947–2955.

Bascove, M., Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Tschirhart, E. et Frippiat, J.-P. (2009). Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB Journal.* **23**, 1607–1615.

Becherer, J. D., Alsenz, J. et Lambris, J. D. (1990). Molecular aspects of C3 interactions and structural/functional analysis of C3 from different species. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **153**, 45–72.

Beetz, S., Diekhoff, D. et Steiner, L. A. (2007). Characterization of terminal deoxynucleotidyl transferase and polymerase mu in zebrafish. *Immunogenetics.* **59**, 735–744.

Belay, T., Aviles, H., Vance, M., Fountain, K. et Sonnenfeld, G. (2003). Catecholamines and in vitro growth of pathogenic bacteria: Enhancement of growth varies greatly among bacterial species. *Life Sciences.* **73**, 1527–1535.

Belda, X., Márquez, C. et Armario, A. (2004). Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: comparison of two outbred rat strains. *Behav. Brain Res.* **154**, 399–408.

Bennett, M. F. (1986). Stress and changes in the blood of newts, *Notophthalmus viridescens*, during early regeneration. *J. Comp. Physiol. A.* **159**, 823–826.

Berek, C., Berger, A. et Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell.* **67**, 1121–1129.

Bertocci, B., De Smet, A., Weill, J.-C. et Reynaud, C.-A. (2006). Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination *in vivo*. *Immunity.* **25**, 31–41.

Bhakdi, S. et Tranum-Jensen, J. (1991). Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol. Today*. **12**, 318–320.

Bhatnagar, S. et Dallman, M. (1998). Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience.* **84**, 1025–1039.

Biswas, R., Roy, T. et Chattopadhyay, U. (2006). Prolactin induced reversal of glucocorticoid mediated apoptosis of immature cortical thymocytes is abrogated by induction of tumor. *J. Neuroimmunol*. **171**, 120–134.

Blaustein, A. R. et Belden, L. K. (2003). Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation. *Evol. Dev.* **5**, 89–97.

Blunt, T., Finnie, N. J., Taccioli, G. E., Smith, G. C., Demengeot, J., Gottlieb, T. M., Mizuta, R., Varghese, A. J., Alt, F. W. et Jeggo, P. A. (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell.* **80**, 813–823.

Bokisch, V. A., Müller-Eberhard, H. J. et Cochrane, C. G. (1969). Isolation of a fragment (C3a) of the third component of human complement containing anaphylatoxin and chemotactic activity and description of an anaphylatoxin inactivator of human serum. *J. Exp. Med.* **129**, 1109–1130.

Bonneau, R. H., Sheridan, J. F., Feng, N. G. et Glaser, R. (1991). Stress-induced suppression of herpes simplex virus (HSV)-specific cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell activity and enhancement of acute pathogenesis following local HSV infection. *Brain Behav. Immun.* **5**, 170–192.

Boonyaratanakornkit, J. B., Cogoli, A., Li, C.-F., Schopper, T., Pippia, P., Galleri, G., Meloni, M. A. et Hughes-Fulford, M. (2005). Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J.* **19**, 2020–2022.

Boudarra, N., Frippiat, C., Dournon, C. et Frippiat, J.-P. (2002). An alternative internal splicing site defines new Ikaros isoforms in *Pleurodeles waltl*. *Dev. Comp. Immunol.* **26**, 659–673.

Bouwknecht, J., Olivier, B. et Paylor, R. E. (2007). The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **31**, 41–59.

Boxio, R., Dournon, C. et Frippiat, J.-P. (2005). Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Appl. Physiol.* **98**, 905–910.

Brenner, G. J., Cohen, N., Ader, R. et Moynihan, J. A. (1990). Increased pulmonary metastases and natural killer cell activity in mice following handling. *Life Sciences.* **47**, 1813–1819.

Burikhanov, R. B., Wakame, K., Igarashi, Y., Wang, S. et Matsuzaki, S. (2000). Suppressive effect of active hexose correlated compound (AHCC) on thymic apoptosis induced by dexamethasone in the rat. *Endocr. Regul*. **34**, 181–188.

Cacioppo, J. T., Kiecolt-Glaser, J. K., Malarkey, W. B., Laskowski, B. F., Rozlog, L. A., Poehlmann, K. M., Burleson, M. H. et Glaser, R. (2002). Autonomic and glucocorticoid associations with the steady-state expression of latent Epstein-Barr virus. *Horm. Behav.* **42**, 32–41.

Calcagni, E. et Elenkov, I. (2006). Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. **1069**, 62–76.

Capp, J.-P., Boudsocq, F., Besnard, A.-G., Lopez, B. S., Cazaux, C., Hoffmann, J.-S. et Canitrot, Y. (2007). Involvement of DNA polymerase mu in the repair of a specific subset of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **35**, 3551–3560.

Carotta, S. et Nutt, S. L. (2008). Losing B cell identity. *Bioessays.* **30**, 203–207.

Carreño, P. C., Jiménez, E., Sacedón, R., Vicente, A. et Zapata, A. G. (2004). Prolactin stimulates maturation and function of rat thymic dendritic cells. *J. Neuroimmunol.* **153**, 83–90.

Carreño, P. C., Sacedón, R., Jiménez, E., Vicente, A. et Zapata, A. G. (2005). Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J. Neuroimmunol*. **160**, 135–145.

Castillo, M. G., Goodson, M. S. et McFall-Ngai, M. (2009). Identification and molecular characterization of a complement C3 molecule in a lophotrochozoan, the Hawaiian bobtail squid Euprymna scolopes. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 69–76.

Cernysiov, V., Gerasimcik, N., Mauricas, M. et Girkontaite, I. (2010). Regulation of T-cell-independent and T-cell-dependent antibody production by circadian rhythm and melatonin. *Int. Immunol.* **22**, 25–34.

Chapes, S. K., Simske, S. J., Sonnenfeld, G., Miller, E. S. et Zimmerman, R. J. (1999). Effects of spaceflight and PEG-IL-2 on rat physiological and immunological responses. *J. Appl. Physiol.* **86**, 2065–2076.

Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R. T., Datta, A., Manis, J. et Alt, F. W. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv. Immunol*. **94**, 157–214.

Chopra, V., Fadl, A. A., Sha, J., Chopra, S., Galindo, C. L. et Chopra, A. K. (2006). Alterations in the virulence potential of enteric pathogens and bacterial-host cell interactions under simulated microgravity conditions. *J. Toxicol. Environ. Health Part A.* **69**, 1345–1370.

Choukèr, A., Smith, L., Christ, F., Larina, I., Nichiporuk, I., Baranov, V., Bobrovnik, E., Pastushkova, L., Messmer, K., Peter, K. et Thiel, M. (2002). Effects of confinement (110 and 240 days) on neuroendocrine stress response and changes of immune cells in men. *J. Appl. Physiol.* **92**, 1619–1627.

Chowdhury, D. et Sen, R. (2004). Regulation of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements. *Immunol. Rev.* **200**, 182–196.

Cogoli, A., Bechler, B., Cogoli-Greuter, M., Criswell, S. B., Joller, H., Joller, P., Hunzinger, E. et Müller, O. (1993). Mitogenic signal transduction in T lymphocytes in microgravity. *J. Leukoc. Biol.* **53**, 569–575.

Cogoli, A., Tschopp, A. et Fuchs-Bislin, P. (1984). Cell sensitivity to gravity. *Science.* **225**, 228–230.

Cogoli-Greuter, M., Lovis, P. et Vadrucci, S. (2004). Signal transduction in T cells: an overview. *J. Gravit. Physiol.* **11**, 53–56.

Cohrs, R. J., Mehta, S. K., Schmid, D. S., Gilden, D. H. et Pierson, D. L. (2008). Asymptomatic reactivation and shed of infectious varicella zoster virus in astronauts. *J. Med. Virol.* **80**, 1116–1122.

Collard, C. D., Väkevä, A., Büküsoglu, C., Zünd, G., Sperati, C. J., Colgan, S. P. et Stahl, G. L. (1997). Reoxygenation of hypoxic human umbilical vein endothelial cells activates the classic complement pathway. *Circulation.* **96**, 326–333.

Collard, C. D., Väkevä, A., Morrissey, M. A., Agah, A., Rollins, S. A., Reenstra, W. R., Buras, J. A., Meri, S. et Stahl, G. L. (2000). Complement activation after oxidative stress: role of the lectin complement pathway. *Am. J. Pathol.* **156**, 1549–1556.

Collis, A. V. J., Brouwer, A. P. et Martin, A. C. R. (2003). Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J. Mol. Biol.* **325**, 337–354.

Combriato, G. et Klobeck, H. G. (2002). Regulation of human Ig lambda light chain gene expression by NF-kappa B. *J. Immunol.* **168**, 1259–1266.

Congdon, C. C., Allebban, Z., Gibson, L. A., Kaplansky, A., Strickland, K. M., Jago, T. L., Johnson, D. L., Lange, R. D. et Ichiki, A. T. (1996). Lymphatic tissue changes in rats flown on Spacelab Life Sciences-2. *J. Appl. Physiol*. **81**, 172–177.

Conrad, C. D., LeDoux, J. E., Magariños, A. M. et McEwen, B. S. (1999). Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav. Neurosci.* **113**, 902–913.

Cooper, D. et Pellis, N. R. (1998). Suppressed PHA activation of T lymphocytes in simulated microgravity is restored by direct activation of protein kinase C. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 550–562.

Corcoran, A. E., Smart, F. M., Cowling, R. J., Crompton, T., Owen, M. J. et Venkitaraman, A. R. (1996). The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis. *EMBO J*. **15**, 1924–1932.

Corneo, B., Moshous, D., Güngör, T., Wulffraat, N., Philippet, P., Le Deist, F. L., Fischer, A. et de Villartay, J. P. (2001). Identical mutations in RAG1 or RAG2 genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B-severe combined immune deficiency or Omenn syndrome. *Blood*. **97**, 2772–2776.

Coskun, O., Sener, K., Kilic, S., Erdem, H., Yaman, H., Besirbellioglu, A. B., Gul, H. C. et Eyigun, C. P. (2010). Stress-related Epstein-Barr virus reactivation. *Clin. Exp. Med.* **10**, 15–20.

Crucian, B. E., Cubbage, M. L. et Sams, C. F. (2000). Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. *J. Interferon Cytokine Res.* **20**, 547–556.

Crucian, B. E., Stowe, R. P., Pierson, D. L. et Sams, C. F. (2008). Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviat. Space Environ. Med.* **79**, 835–843.

Curtin, C. et Carroll, I. (2009). Cutaneous neuroma physiology and its relationship to chronic pain. *J. Hand Surg. Am.* **34**, 1334–1336.

Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K. et Steiner, L. A. (2005). The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* **6**, 295–302.

Davis, T. A., Wiesmann, W., Kidwell, W., Cannon, T., Kerns, L., Serke, C., Delaplaine, T., Pranger, A. et Lee, K. P. (1996). Effect of spaceflight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myelopoiesis. *J. Leukoc. Biol*. **60**, 69–76.

De Bellis, A., Bizzarro, A., Pivonello, R., Lombardi, G. et Bellastella, A. (2005). Prolactin and autoimmunity. *Pituitary.* **8**, 25–30.

Diaz, M., Greenberg, A. S. et Flajnik, M. F. (1998). Somatic hypermutation of the new antigen receptor gene (NAR) in the nurse shark does not generate the repertoire: possible role in antigen-driven reactions in the absence of germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14343–14348.

Diaz, M., Velez, J., Singh, M., Cerny, J. et Flajnik, M. F. (1999). Mutational pattern of the nurse shark antigen receptor gene (NAR) is similar to that of mammalian Ig genes and to spontaneous mutations in evolution: the translesion synthesis model of somatic hypermutation. *Int. Immunol*. **11**, 825–833.

Domdey, H., Wiebauer, K., Kazmaier, M., Müller, V., Odink, K. et Fey, G. (1982). Characterization of the mRNA and cloned cDNA specifying the third component of mouse complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 7619–7623.

Domínguez, O., Ruiz, J. F., Laín de Lera, T., García-Díaz, M., González, M. A., Kirchhoff, T., Martínez-A, C., Bernad, A. et Blanco, L. (2000). DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *EMBO J.* **19**, 1731–1742.

Dorshkind, K. et Horseman, N. D. (2001). Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessays.* **23**, 288–294.

Dournon, C. (2003). Developmental biology of urodele amphibians in microgravity conditions. Adv. *Space Biol. Med*. **9**, 101–131.

Du Pasquier, L., Robert, J., Courtet, M. et Mussmann, R. (2000). B-cell development in the amphibian Xenopus. *Immunol. Rev*. **175**, 201–213.

Durnova, G. N., Kaplansky, A. S. et Portugalov, V. V. (1976). Effect of a 22-day space flight on the lymphoid organs of rats. *Aviat. Space Environ. Med*. **47**, 588–591.

Edholm, E.-S., Bengten, E. et Wilson, M. (2011). Insights into the function of IgD. *Dev. and Comp. Immunol.* **35**, 1309–1316.

Ehrhard, P. B., Erb, P., Graumann, U. et Otten, U. (1993). Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10984–10988.

Elenkov et Chrousos (1999). Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **10**, 359–368.

Engelsma, M. Y., Hougee, S., Nap, D., Hofenk, M., Rombout, J. H. W. M., van Muiswinkel, W. B. et Lidy Verburg-van Kemenade, B. M. (2003). Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio L. Fish Shellfish Immunol*. **15**, 397–410.

Espinoza, C. R. et Feeney, A. J. (2005). The extent of histone acetylation correlates with the differential rearrangement frequency of individual VH genes in pro-B cells. *J. Immunol.* **175**, 6668–6675.

Esser, A. F. (1991). Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol. Today.* **12**, 316–318.

Esterling, B. A., Kiecolt-Glaser, J. K., Bodnar, J. C. et Glaser, R. (1994). Chronic stress, social support, and persistent alterations in the natural killer cell response to cytokines in older adults. *Health Psychol.* **13**, 291–298.

Esterling, B. A., Kiecolt-Glaser, J. K. et Glaser, R. (1996). Psychosocial modulation of cytokine-induced natural killer cell activity in older adults. *Psychosom. Med.* **58**, 264–272.

Felix, K., Wise, K., Manna, S., Yamauchi, K., Wilson, B. L., Thomas, R. L., Kulkarni, A., Pellis, N. R. et Ramesh, G. T. (2004). Altered cytokine expression in tissues of mice subjected to simulated microgravity. *Mol. Cell. Biochem.* **266**, 79–85.

Flajnik, M. F. (2002). Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat. Rev. Immunol*. **2**, 688–698.

Fleming, S. D., Edelman, L. S. et Chapes, S. K. (1991). Effects of corticosterone and microgravity on inflammatory cell production of superoxide. *J. Leukoc. Biol.* **50**, 69–76.

Fong, K.Y., Botto, M., Walport, M.J., So, A.K. (1990). Genomic organization of human complement component C3. *Genomics.* **7**, 579-586.

Frank, M. M. et Fries, L. F. (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today.* **12**, 322–326.

Freire-Garabal, M., Núñez, M. J., Fernández-Rial, J. C., Couceiro, J., García-Vallejo, L. et Rey-Méndez, M. (1993). Phagocytic activity in stressed mice: effects of alprazolam. *Res. Immunol.* **144**, 311–316.

Frippiat, C., Kremarik, P., Ropars, A., Dournon, C. et Frippiat, J. P. (2001). The recombination-activating gene 1 of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) is transcribed in lymphoid tissues and in the central nervous system. *Immunogenetics.* **52**, 264–275.

Fugmann, S. D., Lee, A. I., Shockett, P. E., Villey, I. J. et Schatz, D. G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 495–527.

Fujii, T., Nakamura, T. et Tomonaga, S. (1995). Component C3 of hagfish complement has a unique structure: identification of native C3 and its degradation products. *Mol. Immunol.* **32**, 633–642.

Fukui, Y., Sudo, N., Yu, X. N., Nukina, H., Sogawa, H. et Kubo, C. (1997). The restraint stress-induced reduction in lymphocyte cell number in lymphoid organs correlates with the suppression of in vivo antibody production. *J. Neuroimmunol.* **79**, 211–217.

Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E. et Busslinger, M. (2004). Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev.* **18**, 411–422.

Gala, R. R. (1990). The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci.* **46**, 1407–1420.

García-Díaz, M., Domínguez, O., López-Fernández, L. A., de Lera, L. T., Saníger, M. L., Ruiz, J. F., Párraga, M., García-Ortiz, M. J., Kirchhoff, T., del Mazo, J., Bernad, A. et Blanco, L. (2000). DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J. Mol. Biol.* **301**, 851–867.

Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C. et Mathis, D. (1993). Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. Science. **261**, 1175–1178.

Glaser, R., Kennedy, S., Lafuse, W. P., Bonneau, R. H., Speicher, C., Hillhouse, J. et Kiecolt-Glaser, J. K. (1990). Psychological stress-induced modulation of interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 production in peripheral blood leukocytes. *Arch. Gen. Psychiatry*. **47**, 707–712.

Glaser, R., Mehl, V. S., Penn, G., Speicher, C. E. et Kiecolt-Glaser, J. K. (1986). Stress-associated changes in plasma immunoglobulin levels. *Int. J. Psychosom.* **33**, 41–42.

Glaser, R., Pearson, G. R., Bonneau, R. H., Esterling, B. A., Atkinson, C. et Kiecolt-Glaser, J. K. (1993). Stress and the memory T-cell response to the Epstein-Barr virus in healthy medical students. *Health Psychol.* **12**, 435–442.

Goldberger, G., Thomas, M. L., Tack, B. F., Williams, J., Colten, H. R. et Abraham, G. N. (1981). NH2-terminal structure and cleavage of guinea pig pro-C3, the precursor of the third complement component. *J. Biol. Chem.* **256**, 12617–12619.

Goldmit, M. et Bergman, Y. (2004). Monoallelic gene expression: a repertoire of recurrent themes. *Immunol. Rev.* **200**, 197–214.

Goodarzi, A. A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S. A., Ye, R., Härer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P. A. et Lees-Miller, S. P. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* **25**, 3880–3889.

Gozalbo-López, B., Andrade, P., Terrados, G., de Andrés, B., Serrano, N., Cortegano, I., Palacios, B., Bernad, A., Blanco, L., Marcos, M. A. R. et Gaspar, M. L. (2009). A role for DNA polymerase mu in the emerging DJH rearrangements of the postgastrulation mouse embryo. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1266–1275.

Grawunder, U., Zimmer, D., Kulesza, P. et Lieber, M. R. (1998). Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**, 24708–24714.

Gridley, D. S., Nelson, G. A., Peters, L. L., Kostenuik, P. J., Bateman, T. A., Morony, S., Stodieck, L. S., Lacey, D. L., Simske, S. J. et Pecaut, M. J. (2003). Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. II. Activation, cytokines, erythrocytes, and platelets. *J. Appl. Physiol.* **94**, 2095–2103.

Gridley, D. S., Pecaut, M. J., Dutta-Roy, R. et Nelson, G. A. (2002). Dose and dose rate effects of whole-body proton irradiation on leukocyte populations and lymphoid organs: Part I. *Immunology Letters.* **80**, 55–66.

Gridley, D. S., Rizvi, A., Luo-Owen, X., Makinde, A. Y., Coutrakon, G. B., Koss, P., Slater, J. M. et Pecaut, M. J. (2008). Variable hematopoietic responses to acute photons, protons and simulated solar particle event protons. *In Vivo.* **22**, 159–169.

Gridley, D. S., Slater, J. M., Luo-Owen, X., Rizvi, A., Chapes, S. K., Stodieck, L. S., Ferguson, V. L. et Pecaut, M. J. (2009). Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J. Appl. Physiol.* **106**, 194–202.

Grove, D. S., Pishak, S. A. et Mastro, A. M. (1995). The effect of a 10-day space flight on the function, phenotype, and adhesion molecule expression of splenocytes and lymph node lymphocytes. *Exp. Cell Res*. **219**, 102–109.

Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M. F. et Lieber, M. R. (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J*. **26**, 1010–1023.

Guéguinou, N., Bojados, M., Jamon, M., Derradji, H., Baatout, S., Tschirhart, E., Frippiat, J.-P. et Legrand-Frossi, C. (2012). Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice. *Psychoneuroendocrinology*. **37**, 137–147.

Guo, P., Hirano, M., Herrin, B. R., Li, J., Yu, C., Sadlonova, A. et Cooper, M. D. (2009). Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. *Nature*. **459**, 796–801.

Gust, D. A., Gordon, T. P., Wilson, M. E., Brodie, A. R., Ahmed-Ansari, A. et McClure, H. M. (1992). Removal from natal social group to peer housing affects cortisol levels and absolute numbers of T cell subsets in juvenile rhesus monkeys. *Brain Behav. Immun.* **6**, 189–199.

Hadjiconstantinou, M., McGuire, L., Duchemin, A. M., Laskowski, B., Kiecolt-Glaser, J. et Glaser, R. (2001). Changes in plasma nerve growth factor levels in older adults associated with chronic stress. *J. Neuroimmunol.* **116**, 102–106.

Hales, N. W., Yamauchi, K., Alicea, A., Sundaresan, A., Pellis, N. R. et Kulkarni, A. D. (2002). A countermeasure to ameliorate immune dysfunction in in vitro simulated microgravity environment: role of cellularnucleotide nutrition. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **38**, 213–217.

Hammond, T. G., Benes, E., O'Reilly, K. C., Wolf, D. A., Linnehan, R. M., Taher, A., Kaysen, J. H., Allen, P. L. et Goodwin, T. J. (2000). Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle. *Physiol. Genomics.* **3**, 163–173.

Hansen, J. D., Landis, E. D. et Phillips, R. B. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 6919–6924.

Harding, F. A., Cohen, N. et Litman, G. W. (1990). Immunoglobulin heavy chain gene organization and complexity in the skate, Raja erinacea. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1015–1020.

Harris, R. B. S., Gu, H., Mitchell, T. D., Endale, L., Russo, M. et Ryan, D. H. (2004). Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. *Physiol. Behav.* **81**, 557–568.

Hart, M. L., Walsh, M. C. et Stahl, G. L. (2004). Initiation of complement activation following oxidative stress. In vitro and in vivo observations. *Mol. Immunol.* **41**, 165–171.

Hatton, J. P., Gaubert, F., Cazenave, J.-P. et Schmitt, D. (2002). Microgravity modifies protein kinase C isoform translocation in the human monocytic cell line U937 and human peripheral blood T-cells. *J. Cell. Biochem*. **87**, 39–50.

Heyer, B. S., MacAuley, A., Behrendtsen, O. et Werb, Z. (2000). Hypersensitivity to DNA damage leads to increased apoptosis during early mouse development. *Genes Dev.* **14**, 2072–2084.

Hieter, P. A., Hollis, G. F., Korsmeyer, S. J., Waldmann, T. A. et Leder, P. (1981). Clustered arrangement of immunoglobulin lambda constant region genes in man. *Nature.* **294**, 536–540.

Holen, E., Bjørge, O. A. et Jonsson, R. (2006). Dietary nucleotides and human immune cells. II. Modulation of PBMC growth and cytokine secretion. *Nutrition.* **22**, 90–96.

Huang, J. et Muegge, K. (2001). Control of chromatin accessibility for V(D)J recombination by interleukin-7. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 907–911.

Huang, W., Xie, P., Xu, M., Li, P. et Zao, G. (2011). The influence of stress factors on the reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in infected mice. *Cell Biochem. Biophys.* **61**, 115–122.

Ichiki, A. T., Gibson, L. A., Jago, T. L., Strickland, K. M., Johnson, D. L., Lange, R. D. et Allebban, Z. (1996). Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 37–43.

Ilyin, V. K. (2005). Microbiological status of cosmonauts during orbital spaceflights on Salyut and Mir orbital stations. *Acta Astronaut.* **56**, 839–850.

Ingber, D. (1999). How cells (might) sense microgravity. *FASEB J*. **13**, Suppl: S3–S15.

Irwin, M., Lacher, U. et Caldwell, C. (1992). Depression and reduced natural killer cytotoxicity: a longitudinal study of depressed patients and control subjects. *Psychol Med.* **22**, 1045–1050.

Jansen, J. G., Langerak, P., Tsaalbi-Shtylik, A., van den Berk, P., Jacobs, H. et de Wind, N. (2006). Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J. Exp. Med.* **203**, 319–323.

Jeggo, P. A. (1998). DNA breakage and repair. *Adv. Genet*. **38**, 185–218.

Jhunjhunwala, S., van Zelm, M. C., Peak, M. M. et Murre, C. (2009). Chromatin architecture and the generation of antigen receptor diversity. *Cell.* **138**, 435–448.

Johnson, K., Angelin-Duclos, C., Park, S. et Calame, K. L. (2003). Changes in histone acetylation are associated with differences in accessibility of V(H) gene segments to V-DJ recombination during B-cell ontogeny and development. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2438–2450.

Kaur, I., Simons, E. R., Castro, V. A., Ott, C. M. et Pierson, D. L. (2005). Changes in monocyte functions of astronauts. *Brain Behav. Immun.* **19**, 547–554.

Kaur, I., Simons, E. R., Kapadia, A. S., Ott, C. M. et Pierson, D. L. (2008). Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1523–1528.

Kelley, K. W., Arkins, S. et Li, Y. M. (1992). Growth hormone, prolactin, and insulin-like growth factors: new jobs for old players. *Brain Behav. Immun.* **6**, 317–326.

Kelley, K. W. et Dantzer, R. (1991). Growth hormone and prolactin as natural antagonists of glucocorticoids in immunoregulation. *Stress and Immunity. USA: Plotnikoff*, N. 433–452.

Kennedy, A. R., Ware, J. H., Guan, J., Donahue, J. J., Biaglow, J. E., Zhou, Z., Stewart, J., Vazquez, M. et Wan, X. S. (2004). Selenomethionine protects against adverse biological effects induced by space radiation. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 259–266.

Khamlichi, A. A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M. et Cogné, M. (2004). Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood*. **103**, 3828–3836.

Kiecolt-Glaser, J. K., Garner, W., Speicher, C., Penn, G. M., Holliday, J. et Glaser, R. (1984). Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom. Med.* **46**, 7–14.

Kiecolt-Glaser, J. K., Malarkey, W. B., Chee, M., Newton, T., Cacioppo, J. T., Mao, H. Y. et Glaser, R. (1993). Negative behavior during marital conflict is associated with immunological down-regulation. *Psychosom. Med*. **55**, 395–409.

Kim, M.-H., Yang, J.-Y., Upadhaya, S. D., Lee, H.-J., Yun, C.-H. et Ha, J. K. (2011). The stress of weaning influences serum levels of acute-phase proteins, iron-binding proteins, inflammatory cytokines, cortisol, and leukocyte subsets in Holstein calves. *J. Vet. Sci*. **12**, 151–157.

Kimzey, S. L., Johnson, P. C., Ritzman, S. E. et Mengel, C. E. (1976). Hematology and immunology studies: the second manned Skylab mission. *Aviat. Space Environ. Med.* **47**, 383–390.

Kinney, K. S., Austin, C. E., Morton, D. S. et Sonnenfeld, G. (2000). Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacteria--mechanistic studies. *Life Sci.* **67**, 3075–3085.

Kita, S., Shibata, S., Kim, H., Otsubo, A., Ito, M. et Iwasaki, K. (2006). Dose-dependent effects of hypergravity on body mass in mature rats. *Aviat. Space Environ. Med.* **77**, 842–845.

Komori, T., Okada, A., Stewart, V. et Alt, F. W. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science.* **261**, 1171–1175.

Konstantinova, I. V., Antropova, E. N., Legen'kov, V. I. et Zazhireĭ, V. D. (1973). [Reactivity of lymphoid blood cells in the crew of « Soiuz-6 », « Soiuz-7 » and « Soiuz-8 » spacecraft before and after flight]. *Kosm. Biol. Med.* **7**, 35–40.

Konstantinova, I. V., Rykova, M., Meshkov, D., Peres, C., Husson, D. et Schmitt, D. A. (1995). Natural killer cells after ALTAIR mission. *Acta Astronaut.* **36**, 713–718.

Konstantinova, I. V., Rykova, M. P., Lesnyak, A. T. et Antropova, E. A. (1993). Immune changes during long-duration missions. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 189–201.

Kooijman, R., Hooghe-Peters, E. L. et Hooghe, R. (1996). Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the immune system. *Adv. Immunol*. **63**, 377–454.

Korbelik, M. (2009). Complement upregulation in photodynamic therapy-treated tumors: Role of Toll-like receptor pathway and NFkappaB. *Cancer Lett.* **281**, 232–238.

Korsmeyer, S. J., Hieter, P. A., Ravetch, J. V., Poplack, D. G., Waldmann, T. A. et Leder, P. (1981). Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 7096–7100.

Korte, S. M. (2001). Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* **25**, 117–142.

Korte, S. M. et De Boer, S. F. (2003). A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol*. **463**, 163–175.

Kroboth, P. D., Salek, F. S., Pittenger, A. L., Fabian, T. J. et Frye, R. F. (1999). DHEA and DHEA-S: a review. *J. Clin. Pharmacol.* **39**, 327–348.

Kulkarni, A. D., Yamauchi, K., Hales, N. W., Ramesh, V., Ramesh, G. T., Sundaresan, A., Andrassy, R. J. et Pellis, N. R. (2002). Nutrition beyond nutrition: plausibility of immunotrophic nutrition for space travel. *Clin. Nutr.* **21**, 231–238.

Kulkarni, A. D., Yamauchi, K., Sundaresan, A., Ramesh, G. T. et Pellis, N. R. (2005). Countermeasure for space flight effects on immune system: nutritional nucleotides. *Gravit. Space Biol. Bull.* **18**, 101–102.

Kusnecov, A. V., Grota, L. J., Schmidt, S. G., Bonneau, R. H., Sheridan, J. F., Glaser, R. et Moynihan, J. A. (1992). Decreased herpes simplex viral immunity and enhanced pathogenesis following stressor administration in mice. *J. Neuroimmunol.* **38**, 129–137.

Lambiase, A., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S., Bonini, S., Starace, G., D'Elios, M. M., De Carli, M. et Aloe, L. (1997). Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, 408–414.

Langerak, P., Nygren, A. O. H., Krijger, P. H. L., van den Berk, P. C. M. et Jacobs, H. (2007). A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification. *J. Exp. Med.* **204**, 1989–1998.

Law, S. K. et Dodds, A. W. (1997). The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci.* **6**, 263–274.

Law, S. K., Minich, T. M. et Levine, R. P. (1981). Binding reaction between the third human complement protein and small molecules. *Biochemistry.* **20**, 7457–7463.

Lazarus, R. S., DeLongis, A., Folkman, S. et Gruen, R. (1985). Stress and adaptational outcomes. The problem of confounded measures. *Am. Psychol.* **40**, 770–785.

Lebsack, T. W., Fa, V., Woods, C. C., Gruener, R., Manziello, A. M., Pecaut, M. J., Gridley, D. S., Stodieck, L. S., Ferguson, V. L. et Deluca, D. (2010). Microarray analysis of spaceflown murine thymus tissue reveals changes in gene expression regulating stress and glucocorticoid receptors. *J. Cell. Biochem*. **110**, 372–381.

Lee, A. et Hsu, E. (1994). Isolation and characterization of the Xenopus terminal deoxynucleotidyl transferase. *J. Immunol*. **152**, 4500–4507.

Lee, S. S., Tranchina, D., Ohta, Y., Flajnik, M. F. et Hsu, E. (2002). Hypermutation in shark immunoglobulin light chain genes results in contiguous substitutions. *Immunity.* **16**, 571–582.

Lefranc MP. (2009). Antibody databases: IMGT, a French platform of world-wide interest. *Med. Sci.* **25**, 1020-1023.

Leroy, V. (2008). Effecteurs immunitaires au cours de l'hépatite virale C : perspectives thérapeutiques. *Hépato-Gastro*. **15**, 127-137**.**

Li, Z., Otevrel, T., Gao, Y., Cheng, H. L., Seed, B., Stamato, T. D., Taccioli, G. E. et Alt, F. W. (1995). The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell.* **83**, 1079–1089.

Liu, H., Schmidt-Supprian, M., Shi, Y., Hobeika, E., Barteneva, N., Jumaa, H., Pelanda, R., Reth, M., Skok, J., Rajewsky, K. et Shi, Y. (2007). Yin Yang 1 is a critical regulator of B-cell development. *Genes Dev.* **21**, 1179–1189.

Lucas, D., Laín de Lera, T., González, M. A., Ruiz, J. F., Domínguez, O., Casanova, J. C., Martínez-A, C., Blanco, L. et Bernad, A. (2005). Polymerase mu is up-regulated during the T cell-dependent immune response and its deficiency alters developmental dynamics of spleen centroblasts. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1601–1611.

Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. et Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell.* **108**, 781–794.

Mage, R. G., Lanning, D. et Knight, K. L. (2006). B cell and antibody repertoire development in rabbits: the requirement of gut-associated lymphoid tissues. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 137–153.

Mäkelä, O. et Litman, G. W. (1980). Lack of heterogeneity in antihapten antibodies of a phylogenetically primitive shark. *Nature*. **287**, 639–640.

Malarkey, W. B., Hall, J. C., Pearl, D. K., Kiecolt-Glaser, J. K. et Glaser, R. (1991). The influence of academic stress and season on 24-hour concentrations of growth hormone and prolactin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**, 1089–1092.

Maldonado, J., Navarro, J., Narbona, E. et Gil, A. (2001). The influence of dietary nucleotides on humoral and cell immunity in the neonate and lactating infant. *Early Hum. Dev.* **65**, Suppl: S69–S74.

Mallis, M. M. et DeRoshia, C. W. (2005). Circadian rhythms, sleep, and performance in space. *Aviat. Space Environ. Med.* **76**, B94–B107.

Manis, J. P., Tian, M. et Alt, F. W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* **23**, 31–39.

Marin, M. T., Cruz, F. C. et Planeta, C. S. (2007). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol. Behav.* **90**, 29–35.

Márquez, C., Nadal, R. et Armario, A. (2004). The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats : individual differences. *Neuroscience.* **123**, 601–612.

Marr, S., Morales, H., Bottaro, A., Cooper, M., Flajnik, M. et Robert, J. (2007). Localization and differential expression of activation-induced cytidine deaminase in the amphibian Xenopus upon antigen stimulation and during early development. *J. Immunol.* **179**, 6783–6789.

Matera, L., Muccioli, G., Cesano, A., Bellussi, G. et Genazzani, E. (1988). Prolactin receptors on large granular lymphocytes: dual regulation by cyclosporin A. *Brain Behav. Immun.* **2**, 1–10.

Matsui, Y., Uhara, J., Satoi, S., Kaibori, M., Yamada, H., Kitade, H., Imamura, A., Takai, S., Kawaguchi, Y., Kwon, A.-H. et Kamiyama, Y. (2002). Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study. *J. Hepatol.* **37**, 78–86.

Matsumoto, M., Lo, S. F., Carruthers, C. J., Min, J., Mariathasan, S., Huang, G., Plas, D. R., Martin, S. M., Geha, R. S., Nahm, M. H. et Chaplin, D. D. (1996). Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *Nature.* **382**, 462–466.

Maule, J., Fogel, M., Steele, A., Wainwright, N., Pierson, D. L. et McKay, D. S. (2003). Antibody binding in altered gravity: implications for immunosorbent assay during space flight. *J. Gravit. Physiol.* **10**, 47–55.

McBlane, F. et Boyes, J. (2000). Stimulation of V(D)J recombination by histone acetylation. *Curr. Biol.* **10**, 483–486.

Medzhitov, R. et Janeway, C. A., Jr (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* **91**, 295–298.

Meehan, R., Whitson, P. et Sams, C. (1993). The role of psychoneuroendocrine factors on spaceflight-induced immunological alterations. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 236–244.

Mehta, S. K., Kaur, I., Grimm, E. A., Smid, C., Feeback, D. L. et Pierson, D. L. (2001). Decreased non-MHC-restricted (CD56+) killer cell cytotoxicity after spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **91**, 1814–1818.

Melamed, I., Kelleher, C. A., Franklin, R. A., Brodie, C., Hempstead, B., Kaplan, D. et Gelfand, E. W. (1996). Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocytes is mediated by gp140trk. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1985–1992.

Mercier, S., Frédéric, Canini, Buguet, A., Cespuglio, R., Martin, S. et Bourdon, L. (2003). Behavioural changes after an acute stress: stressor and test types influences. *Behav. Brain Res.* **139**, 167–175.

Miracle, A. L., Anderson, M. K., Litman, R. T., Walsh, C. J., Luer, C. A., Rothenberg, E. V. et Litman, G. W. (2001). Complex expression patterns of lymphocyte-specific genes during the development of cartilaginous fish implicate unique lymphoid tissues in generating an immune repertoire. *Int. Immunol.* **13**, 567–580.

Mizobe, K., Kishihara, K., Ezz-Din El-Naggar, R., Madkour, G. A., Kubo, C. et Nomoto, K. (1997). Restraint stress-induced elevation of endogenous glucocorticoid suppresses migration of granulocytes and macrophages to an inflammatory locus. *J. Neuroimmunol.* **73**, 81–89.

Mizoguchi, K., Sun, N., Jin, X.-L., Kase, Y., Takeda, S., Maruyama, W. et Tabira, T. (2007). Saikokaryukotsuboreito, a herbal medicine, prevents chronic stress-induced dysfunction of glucocorticoid negative feedback system in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **86**, 55–61.

Molnár, A., Wu, P., Largespada, D. A., Vortkamp, A., Scherer, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Bruns, G. et Georgopoulos, K. (1996). The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J. Immunol.* **156**, 585–592.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S. et Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell.* **68**, 869–877.

Moon, A. F., Garcia-Diaz, M., Batra, V. K., Beard, W. A., Bebenek, K., Kunkel, T. A., Wilson, S. H. et Pedersen, L. C. (2007). The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases. *DNA Repair (Amst.)*. **6**, 1709–1725.

Morey-Holton, E., Globus, R. K., Kaplansky, A. et Durnova, G. (2005). The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv. Space Biol. Med.* **10**, 7–40.

Morgado, J. M., Rama, L., Silva, I., de Jesus Inácio, M., Henriques, A., Laranjeira, P., Pedreiro, S., Rosado, F., Alves, F., Gleeson, M., Pais, M. L., Paiva, A. et Teixeira, A. M. (2011). Cytokine production by monocytes, neutrophils, and dendritic cells is hampered by long-term intensive training in elite swimmers. *European Journal of Applied Physiology*.

Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A. et de Villartay, J. P. (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell.* **105**, 177–186.

Müller-Eberhard, H. J. et Götze, O. (1972). C3 proactivator convertase and its mode of action. *J. Exp. Med.* **135**, 1003–1008.

Mukaida, N., Zachariae, C. C., Gusella, G. L. et Matsushima, K. (1991). Dexamethasone inhibits the induction of monocyte chemotactic-activating factor production by IL-1 or tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **146**, 1212–1215.

Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O. et Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 18470–18476.

Nagafuchi, S., Hachimura, S., Totsuka, M., Takahashi, T., Goto, M., Yajima, T., Kuwata, T., Habu, S. et Kaminogawa, S. (2000). Dietary nucleotides can up-regulate antigen-specific Th1 immune responses and suppress antigen-specific IgE responses in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **122**, 33–41.

Nash, P. V. et Mastro, A. M. (1992). Variable lymphocyte responses in rats after space flight. *Exp. Cell Res.* **202**, 125–131.

Navarro, J., Ruiz-Bravo, A., Jiménez-Valera, M. et Gil, A. (1996). Modulation of antibody-forming cell and mitogen-driven lymphoproliferative responses by dietary nucleotides in mice. *Immunol. Lett.* **53**, 141–145.

Nick McElhinny, S. A., Havener, J. M., Garcia-Diaz, M., Juárez, R., Bebenek, K., Kee, B. L., Blanco, L., Kunkel, T. A. et Ramsden, D. A. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol. Cell.* **19**, 357–366.

Nickerson, C. A., Ott, C. M., Mister, S. J., Morrow, B. J., Burns-Keliher, L. et Pierson, D. L. (2000). Microgravity as a novel environmental signal affecting Salmonella enterica serovar Typhimurium virulence. *Infect. Immun.* **68**, 3147–3152.

Nogusa, S., Gerbino, J. et Ritz, B. W. (2009). Low-dose supplementation with active hexose correlated compound improves the immune response to acute influenza infection in C57BL/6 mice. *Nutr Res.* **29**, 139–143.

Nosaka, T., van Deursen, J. M., Tripp, R. A., Thierfelder, W. E., Witthuhn, B. A., McMickle, A. P., Doherty, P. C., Grosveld, G. C. et Ihle, J. N. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science.* **270**, 800–802.

O'Donnell, P. M., Orshal, J. M., Sen, D., Sonnenfeld, G. et Aviles, H. O. (2009). Effects of exposure of mice to hindlimb unloading on leukocyte subsets and sympathetic nervous system activity. *Stress.* **12**, 82–88.

Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. et Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science.* **248**, 1517–1523.

Okazaki, I., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Yoshikawa, K. et Honjo, T. (2002). The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature.* **416**, 340–345.

Otten, U., Ehrhard, P. et Peck, R. (1989). Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 10059–10063.

Padgett, D. A., Sheridan, J. F., Dorne, J., Berntson, G. G., Candelora, J. et Glaser, R. (1998). Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7231–7235.

Padovan, C. M. et Guimarães, F. S. (2000). Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *J. Med. Biol. Res.* **33**, 79–83.

Palermo Neto, J., Massoco, C. O. et Fávare, R. C. (2001). Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Neurotoxicol Teratol.* **23**, 497–507.

Pariante, C. M., Carpiniello, B., Orrù, M. G., Sitzia, R., Piras, A., Farci, A. M., Del Giacco, G. S., Piludu, G. et Miller, A. H. (1997). Chronic caregiving stress alters peripheral blood immune parameters: the role of age and severity of stress. *Psychother Psychosom.* **66**, 199–207.

Park, S. Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H., Hirayama, N., Miyake, K., Nakauchi, H., Shirasawa, T. et Saito, T. (1995). Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity.* **3**, 771–782.

Paus, D., Phan, T. G., Chan, T. D., Gardam, S., Basten, A. et Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* **203**, 1081–1091.

Pauza, M. E., Rehmann, J. A. et LeBien, T. W. (1993). Unusual patterns of immunoglobulin gene rearrangement and expression during human B cell ontogeny: human B cells can simultaneously express cell surface kappa and lambda light chains. *J. Exp. Med.* **178**, 139–149.

Pecaut, M. J., Miller, G. M., Nelson, G. A. et Gridley, D. S. (2004). Hypergravity-induced immunomodulation in a rodent model: hematological and lymphocyte function analyses. *J. Appl. Physiol.* **97**, 29–38.

Pecaut, M. J., Nelson, G. A., Peters, L. L., Kostenuik, P. J., Bateman, T. A., Morony, S., Stodieck, L. S., Lacey, D. L., Simske, S. J. et Gridley, D. S. (2003). Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. I. Immune population distributions. *J. Appl. Physiol.* **94**, 2085–2094.

Pecaut, M. J., Simske, S. J. et Fleshner, M. (2000). Spaceflight induces changes in splenocyte subpopulations: effectiveness of ground-based models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**, 2072–2078.

Peters, G., Nüßgen, A., Raabe, A. et Möck, A. (1991). Social stress induces structural and functional alterations of phagocytes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Fish & Shellfish Immunology.* **1**, 17–31.

Pierson, D. L. (2001). Microbial contamination of spacecraft. *Gravit Space Biol Bull.* **14**, 1–6.

Pierson, D. L., Chidambaram, M., Heath, J. D., Mallary, L., Mishra, S. K., Sharma, B. et Weinstock, G. M. (1996). Epidemiology of Staphylococcus aureus during space flight. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**, 273–281.

Pierson, D. L., Mehta, S. K., Magee, B. B. et Mishra, S. K. (1995). Person-to-person transfer of Candida albicans in the spacecraft environment. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**, 145–150.

Pippia, P., Sciola, L., Cogoli-Greuter, M., Meloni, M. A., Spano, A. et Cogoli, A. (1996). Activation signals of T lymphocytes in microgravity. *J. Biotechnol.* **47**, 215–222.

Plett, P. A., Abonour, R., Frankovitz, S. M. et Orschell, C. M. (2004). Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* **32**, 773–781.

Puel, A. et Leonard, W. J. (2000). Mutations in the gene for the IL-7 receptor result in T(-) B(+) NK(+) severe combined immunodeficiency disease. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 468–473.

Qi, Z.-H., Liu, Y.-F., Wang, W.-N., Wu, X., Xin, Y., Lu, Y.-F. et Wang, A.-L. (2011). Molecular characterization and functional analysis of a complement C3 molecule in the orange-spotted grouper (Epinephelus coioides). *Fish Shellfish Immunol.* **31**, 1284–1290.

Rada, C., Di Noia, J. M. et Neuberger, M. S. (2004). Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol. Cell.* **16**, 163–171.

Radford, D. J., Wang, K., McNelis, J. C., Taylor, A. E., Hechenberger, G., Hofmann, J., Chahal, H., Arlt, W. et Lord, J. M. (2010). Dehdyroepiandrosterone sulfate directly activates protein kinase C-beta to increase human neutrophil superoxide generation. *Mol. Endocrinol.* **24**, 813–821.

Ramesh, N., Morio, T., Fuleihan, R., Worm, M., Horner, A., Tsitsikov, E., Castigli, E. et Geha, R. S. (1995). CD40-CD40 ligand (CD40L) interactions and X-linked hyperIgM syndrome (HIGMX-1). *Clin. Immunol. Immunopathol.* **76**, 208–213.

Reynaud, D., Demarco, I. A., Reddy, K. L., Schjerven, H., Bertolino, E., Chen, Z., Smale, S. T., Winandy, S. et Singh, H. (2008). Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. *Nat. Immunol.* **9**, 927–936.

Rogers, C. J., Brissette-Storkus, C. S., Chambers, W. H. et Cameron, J. L. (1999). Acute stress impairs NK cell adhesion and cytotoxicity through CD2, but not LFA-1. *J. Neuroimmunol.* **99**, 230–241.

Romagnani, P., Maggi, L., Mazzinghi, B., Cosmi, L., Lasagni, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Angeli, R., Rotondi, M., Filì, L., Parronchi, P., Serio, M., Maggi, E., Romagnani, S. et Annunziato, F. (2005). CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on Th1 or Th2 cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**, 1372–1379.

Roux, K. H., Greenberg, A. S., Greene, L., Strelets, L., Avila, D., McKinney, E. C. et Flajnik, M. F. (1998). Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 11804–11809.

Ruiz, J. F., Domínguez, O., Laín de Lera, T., Garcia-Díaz, M., Bernad, A. et Blanco, L. (2001). DNA polymerase mu, a candidate hypermutase? *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **356**, 99–109.

Ruiz, J. F., Lucas, D., García-Palomero, E., Saez, A. I., González, M. A., Piris, M. A., Bernad, A. et Blanco, L. (2004). Overexpression of human DNA polymerase mu (Pol mu) in a Burkitt's lymphoma cell line affects the somatic hypermutation rate. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5861–5873.

Rumfelt, L. L., Lohr, R. L., Dooley, H. et Flajnik, M. F. (2004). Diversity and repertoire of IgW and IgM VH families in the newborn nurse shark. *BMC Immunol.* **5**, 8.

Russell, D. H., Kibler, R., Matrisian, L., Larson, D. F., Poulos, B. et Magun, B. E. (1985). Prolactin receptors on human T and B lymphocytes: antagonism of prolactin binding by cyclosporine. *J. Immunol.* **134**, 3027–3031.

Rykova, M. P., Antropova, E. N., Larina, I. M. et Morukov, B. V. (2008). Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. *Acta Astronautica.* **63**, 697–705.

Rykova, M. P., Sonnenfeld, G., Lesnyak, A. T., Taylor, G. R., Meshkov, D. O., Mandel, A. D., Medvedev, A. E., Berry, W. D., Fuchs, B. B. et Konstantinova, I. V. (1992). Effect of spaceflight on natural killer cell activity. *J. Appl. Physiol.* **73**, 196–200.

Saunders, H. L. et Magor, B. G. (2004). Cloning and expression of the AID gene in the channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 657–663.

Savan, R., Aman, A., Sato, K., Yamaguchi, R. et Sakai, M. (2005). Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur. J. Immunol.* **35**, 3320–3331.

Scaccianoce, S., Cigliana, G., Nicolai, R., Muscolo, L. A., Porcu, A., Navarra, D., Perez-Polo, J. R. et Angelucci, L. (1993). Hypothalamic involvement in the activation of the pituitary-adrenocortical axis by nerve growth factor. *Neuroendocrinology.* **58**, 202–209.

Schaerlinger, B., Bascove, M. et Frippiat, J.-P. (2008). A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian Pleurodeles waltl predominantly expressed in larvae. *Mol. Immunol.* **45**, 776–786.

Schatz, D. G. et Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 251–263.

Schatz, D. G., Oettinger, M. A. et Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell.* **59**, 1035–1048.

Schmitt, D. A., Hatton, J. P., Emond, C., Chaput, D., Paris, H., Levade, T., Cazenave, J. P. et Schaffar, L. (1996). The distribution of protein kinase C in human leukocytes is altered in microgravity. *FASEB J.* **10**, 1627–1634.

Schmitt, D. A., Schwarzenberg, M., Tkaczuk, J., Hebrard, S., Brandenberger, G., Mauco, G., Cogoli-Greuter, M. et Abbal, M. (2000). Head-down tilt bed rest and immune responses. *Pflugers Arch.* **441**, 79–84.

Selsing, E. (2006). Ig class switching: targeting the recombinational mechanism. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 249–254.

Shearer, W. T., Ochs, H. D., Lee, B.-N., Cohen, E. N., Reuben, J. M., Cheng, I., Thompson, B., Butel, J. S., Blancher, A., Abbal, M., Aviles, H. et Sonnenfeld, G. (2009). Immune responses in adult female volunteers during the bed-rest model of spaceflight: antibodies and cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 900–905.

Shen, H. M., Poirier, M. G., Allen, M. J., North, J., Lal, R., Widom, J. et Storb, U. (2009). The activation-induced cytidine deaminase (AID) efficiently targets DNA in nucleosomes but only during transcription. *J. Exp. Med.* **206**, 1057–1071.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F. et Stall, A. M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell.* **68**, 855–867.

Silberman, D. M., Wald, M. R. et Genaro, A. M. (2003). Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *J. Neuroimmunol.* **144**, 53–60.

Smider, V., Rathmell, W. K., Lieber, M. R. et Chu, G. (1994). Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. *Science.* **266**, 288–291.

Smith, S. M. et Zwart, S. R. (2008). Nutrition issues for space exploration. *Acta Astronautica.* **63**, 609–613.

Sonnenfeld, G. (1994). Effect of space flight on cytokine production. *Acta Astronautica.* **33**, 143–147.

Sonnenfeld, G., Davis, S., Taylor, G. R., Mandel, A. D., Konstantinova, I. V., Lesnyak, A., Fuchs, B. B., Peres, C., Tkackzuk, J. et Schmitt, D. A. (1996). Effect of space flight on cytokine production and other immunologic parameters of rhesus monkeys. *J. Interferon Cytokine Res.* **16**, 409–415.

Sonnenfeld, G., Foster, M., Morton, D., Bailliard, F., Fowler, N. A., Hakenewerth, A. M., Bates, R. et Miller, E. S., Jr (1998). Spaceflight and development of immune responses. *J. Appl. Physiol.* **85**, 1429–1433.

Sonnenfeld, G., Mandel, A. D., Konstantinova, I. V., Berry, W. D., Taylor, G. R., Lesnyak, A. T., Fuchs, B. B. et Rakhmilevich, A. L. (1992). Spaceflight alters immune cell function and distribution. *J. Appl. Physiol.* **73**, 191–195.

Sonnenfeld, G., Morey, E. R., Williams, J. A. et Mandel, A. D. (1982). Effect of a simulated weightlessness model on the production of rat interferon. *J. Interferon Res.* **2**, 467–470.

Stavnezer, J. et Amemiya, C. T. (2004). Evolution of isotype switching. *Seminars in Immunology*. **16**, 257–275.

Steele, E. J. (2009). Mechanism of somatic hypermutation: critical analysis of strand biased mutation signatures at A:T and G:C base pairs. *Mol. Immunol.* **46**, 305–320.

Stefanski, V., Knopf, G. et Schulz, S. (2001). Long-term colony housing in Long Evans rats: immunological, hormonal, and behavioral consequences. *J. Neuroimmunol.* **114**, 122–130.

Stein, T. P. (2002). Space flight and oxidative stress. *Nutrition.* **18**, 867–871.

Stein, T. P. et Leskiw, M. J. (2000). Oxidant damage during and after spaceflight. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**, 375–382.

Stojiljković, V., Todorović, A., Kasapović, J., Pejić, S. et Pajović, S. B. (2005). Antioxidant enzyme activity in rat hippocampus after chronic and acute stress exposure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1048**, 373–376.

Stott, B. et Korbelik, M. (2007). Activation of complement C3, C5, and C9 genes in tumors treated by photodynamic therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 649–658.

Stowe, R. P., Mehta, S. K., Ferrando, A. A., Feeback, D. L. et Pierson, D. L. (2001). Immune responses and latent herpesvirus reactivation in spaceflight. *Aviat. Space Environ. Med.* **72**, 884–891.

Stowe, R. P., Sams, C. F., Mehta, S. K., Kaur, I., Jones, M. L., Feeback, D. L. et Pierson, D. L. (1999). Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J. Leukoc. Biol*. **65**, 179–186.

Straub, R. H., Konecna, L., Hrach, S., Rothe, G., Kreutz, M., Schölmerich, J., Falk, W. et Lang, B. (1998). Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 2012–2017.

Su, I. et Tarakhovsky, A. (2005). Epigenetic control of B cell differentiation. *Semin. Immunol.* **17**, 167–172.

Su, I.-H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A. N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B. T. et Tarakhovsky, A. (2003). Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* **4**, 124–131.

Taccioli, G. E. et Alt, F. W. (1995). Potential targets for autosomal SCID mutations. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 436–440.

Taccioli, G. E., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A. R., Alt, F. W., Jackson, S. P. et Jeggo, P. A. (1994). Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science.* **265**, 1442–1445.

Tafet, G. E. et Bernardini, R. (2003). Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. Prog. Neuropsychopharmacol. *Biol. Psychiatry.* **27**, 893–903.

Tafet, G. E., Toister-Achituv, M. et Shinitzky, M. (2001). Enhancement of serotonin uptake by cortisol: a possible link between stress and depression. *Cogn. Affect Behav. Neurosci.* **1**, 96–104.

Taylor, G. R. (1974). Space microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **28**, 121–137.

Terui, T., Funayama, M., Terunuma, A., Takahashi, K. et Tagami, H. (2000). Ultraviolet B radiation exerts enhancing effects on the production of a complement component, C3, by interferon-gamma-stimulated cultured human epidermal keratinocytes, in contrast to photochemotherapy and ultraviolet A radiation that show suppressive effects. *Br. J. Dermatol.* **142**, 660–668.

Tian, J., Pecaut, M. J., Slater, J. M. et Gridley, D. S. (2010). Spaceflight modulates expression of extracellular matrix, adhesion, and profibrotic molecules in mouse lung. *J. Appl. Physiol.* **108**, 162–171.

Tixador, R., Gasset, G., Eche, B., Moatti, N., Lapchine, L., Woldringh, C., Toorop, P., Moatti, J. P., Delmotte, F. et Tap, G. (1994). Behavior of bacteria and antibiotics under space conditions. *Aviat Space Environ Med.* **65**, 551–556.

Tomei, F., Ciarrocca, M., Cherubini, E., Rosati, M. V., Monti, C., Capozzella, A. et Tomei, G. (2006). Prolactin levels in workers exposed to chemical, physical and psycho-social urban stressors. *J Occup Health.* **48**, 253–260.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* **302**, 575–581.

Torcia, M., Bracci-Laudiero, L., Lucibello, M., Nencioni, L., Labardi, D., Rubartelli, A., Cozzolino, F., Aloe, L. et Garaci, E. (1996). Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell.* **85**, 345–356.

Uchakin, P. N., Cubbage, M. L., Sams, C. F., Morukov, B. V., Larina, I. V. et Bobrovnik, E. B. (1998). Effects of the 120 days of head-down bed rest on cytokine secretion and its in vitro modulation by glucocorticoids. *J Gravit Physiol.* **5**, 171–172.

Vallabhapurapu, S. et Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 693–733.

Vega, J. A., García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M. et Germanà, A. (2003). Neurotrophins and the immune system. *J. Anat.* **203**, 1–19.

Vernikos, J. (1996). Human physiology in space. *Bioessays.* **18**, 1029–1037.

Voss, E. W., Jr (1984). Prolonged weightlessness and humoral immunity. *Science.* **225**, 214–215.

Wade, C. E. (2005). Responses across the gravity continuum: hypergravity to microgravity. *Adv. Space Biol. Med.* **10**, 225–245.

Wambi, C. O., Sanzari, J. K., Sayers, C. M., Nuth, M., Zhou, Z., Davis, J., Finnberg, N., Lewis-Wambi, J. S., Ware, J. H., El-Deiry, W. S. et Kennedy, A. R. (2009). Protective effects of dietary antioxidants on proton total-body irradiation-mediated hematopoietic cell and animal survival. *Radiat. Res.* **172**, 175–186.

Wambi, C., Sanzari, J., Wan, X. S., Nuth, M., Davis, J., Ko, Y.-H., Sayers, C. M., Baran, M., Ware, J. H. et Kennedy, A. R. (2008). Dietary antioxidants protect hematopoietic cells and improve animal survival after total-body irradiation. *Radiat. Res.* **169**, 384–396.

Wan, X. S., Bloch, P., Ware, J. H., Zhou, Z., Donahue, J. J., Guan, J., Stewart, J. et Kennedy, A. R. (2005). Detection of oxidative stress induced by low- and high-linear energy transfer radiation in cultured human epithelial cells. *Radiat. Res.* **163**, 364–368.

Wang, S., Welte, T., Fang, H., Chang, G.-J. J., Born, W. K., O'Brien, R. L., Sun, B., Fujii, H., Kosuna, K. et Wang, T. (2009). Oral administration of active hexose correlated compound enhances host resistance to West Nile encephalitis in mice. *J. Nutr.* **139**, 598–602.

Wei, L. X., Zhou, J. N., Roberts, A. I. et Shi, Y. F. (2003). Lymphocyte reduction induced by hindlimb unloading: distinct mechanisms in the spleen and thymus. *Cell Res.* **13**, 465–471.

Weterings, E. et Chen, D. J. (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* **18**, 114–124.

White, R. J. (1998). Weightlessness and the human body. *Sci. Am.* **279**, 58–63.

Wilson, M., Hsu, E., Marcuz, A., Courtet, M., Du Pasquier, L. et Steinberg, C. (1992). What limits affinity maturation of antibodies in Xenopus--the rate of somatic mutation or the ability to select mutants? *EMBO J.* **11**, 4337–4347.

Wilson, M., Marcuz, A. et du Pasquier, L. (1995). Somatic mutations during an immune response in Xenopus tadpoles. *Dev. Immunol.* **4**, 227–234.

Xu, C.-R. et Feeney, A. J. (2009). The epigenetic profile of Ig genes is dynamically regulated during B cell differentiation and is modulated by pre-B cell receptor signaling. *J. Immunol.* **182**, 1362–1369.

Yagita, A., Maruyama, S., Wakasugi, S. et Sukegawa, Y. (2002). H-2 haplotype-dependent serum IL-12 production in tumor-bearing mice treated with various mycelial extracts. *In Vivo.* **16**, 49–54.

Yamauchi, K., Hales, N. W., Robinson, S. M., Niehoff, M. L., Ramesh, V., Pellis, N. R. et Kulkarni, A. D. (2002). Dietary nucleotides prevent decrease in cellular immunity in ground-based microgravity analog. *J. Appl. Physiol.* **93**, 161–166.

Yan, C. T., Boboila, C., Souza, E. K., Franco, S., Hickernell, T. R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A. A., Manis, J. P., Rajewsky, K. et Alt, F. W. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature.* **449**, 478–482.

Yang, E. V., Webster Marketon, J. I., Chen, M., Lo, K. W., Kim, S. et Glaser, R. (2010). Glucocorticoids activate Epstein Barr virus lytic replication through the upregulation of immediate early BZLF1 gene expression. *Brain Behav. Immun.* **24**, 1089–1096.

Zachau, H. G. (1993). The immunoglobulin kappa locus-or-what has been learned from looking closely at one-tenth of a percent of the human genome. *Gene.* **135**, 167–173.

Zarrin, A. A., Tian, M., Wang, J., Borjeson, T. et Alt, F. W. (2005). Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 2466–2470.

Zhang, Z., Araghi-Niknam, M., Liang, B., Inserra, P., Ardestani, S. K., Jiang, S., Chow, S. et Watson, R. R. (1999). Prevention of immune dysfunction and vitamin E loss by dehydroepiandrosterone and melatonin supplementation during murine retrovirus infection. *Immunology.* **96**, 291–297.

Zhang, Z., Espinoza, C. R., Yu, Z., Stephan, R., He, T., Williams, G. S., Burrows, P. D., Hagman, J., Feeney, A. J. et Cooper, M. D. (2006). Transcription factor Pax5 (BSAP) transactivates the RAG-mediated V(H)-to-DJ(H) rearrangement of immunoglobulin genes. *Nat. Immunol.* **7**, 616–624.

Zhao, Y., Pan-Hammarström, Q., Zhao, Z. et Hammarström, L. (2005). Identification of the activation-induced cytidine deaminase gene from zebrafish: an evolutionary analysis. *Dev. Comp. Immunol.* **29**, 61–71.

Zivković, I., Rakin, A., Petrović-Djergović, D., Miljković, B. et Mićić, M. (2005). The effects of chronic stress on thymus innervation in the adult rat. *Acta Histochem.* **106**, 449–458.

Résumé

Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'impact des stress associés aux vols spatiaux sur l'immunité humorale du pleurodèle et de la souris.

Chez le pleurodèle adulte, j'ai d'abord étudié l'utilisation des gènes VH lors de la synthèse des chaînes lourdes d'anticorps suite à une immunisation pendant 5 mois à bord de Mir (expérience Genesis en 1999). J'ai ensuite étudié le processus de maturation de l'affinité des anticorps chez ces mêmes animaux. Ce processus s'effectue par l'apparition d'hypermutations somatiques dans les segments variables des gènes d'anticorps. Ces travaux ont permis de montrer que les segments VH sont utilisés différemment sur Terre et dans Mir et que la fréquence des hypermutations est diminuée suite au vol.

Ensuite, j'ai étudié l'impact des stress rencontrés lors d'un autre vol spatial sur la synthèse des premiers anticorps (IgM) chez le pleurodèle en développement (expérience AMPHIBODY en 2006). Le taux d'IgM étant modifié suite à cette expérience, nous avons recréé sur Terre chacun des stress rencontrés en vol (microgravité, hypergravité, choc thermique, radiations, perturbation du rythme circadien et confinement) afin de connaître le(s) stress responsable(s) de cette modification. Ainsi, seule la gravité modifiée affecte l'expression des IgM.

Enfin, j'ai étudié l'impact de l'hypergravité (2G et 3G) sur la réponse au stress et le système immunitaire de la souris. Nous avons mis en évidence une réponse physiologique et comportementale au stress à 3G mais pas à 2G. Pourtant, des modifications du système immunitaire sont constatées dès 2G. Cela montre qu'une modification de la gravité, associée ou non à une réponse au stress, affecte le système immunitaire.

Mots clés *: amphibien urodèle, souris, vol spatial, stress, gravité, immunité, anticorps.*

Abstract

During my PhD, I studied the impact of spaceflight-associated stresses on *Pleurodeles waltl* and *Mus musculus* humoral immunity.

In adult *P. waltl* immunized during 5 months onboard the Mir space station (Genesis experiment in 1999), I first determined how individual VH genes are used. Then, I studied antibodies affinity maturation in these animals. This maturation implies the introduction of somatic hypermutations (SHM) in DNA encoding the variable segments of antibodies genes. These two pieces of work have shown that variable segments of heavy chain gene are differently used and that SHM frequency is reduced when immunization occurs in space.

Then, I studied antibodies production during animal development onboard the international space station (ISS) (AMPHIBODY experiment in 2006). The antibodies production being increased in larvae that developed in the ISS, we recreated in the laboratory each stress encountered during the spaceflight (hypergravity, microgravity, heat shock associated to the re-entry in the atmosphere, radiations, perturbation of circadian rhythm and confinement) to determine their impact on IgM heavy chain transcription. This allowed to observe that only gravity changes affect this transcription.

Finally, I studied the impact of hypergravity (2G and 3G) on the murine immune system. I observed physiological and behavioural stress responses in mice exposed to 3G but not in 2G mice. However, immune system alterations were observed in both the 2G and 3G groups, suggesting that gravity modifications, associated or not with stress responses, are responsible for immune system modifications.

Key words *: urodele amphibian, mice, spaceflight, stress, gravity, immunity, antibody.*