



HAL
open science

Modulation de l'immunité adaptative murine par la micropesanteur simulée, l'hypergravité ou les stress chroniques ultra légers

Fanny Gaignier

► **To cite this version:**

Fanny Gaignier. Modulation de l'immunité adaptative murine par la micropesanteur simulée, l'hypergravité ou les stress chroniques ultra légers. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0171 . tel-01751064

HAL Id: tel-01751064

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751064v1>

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>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



STRESS IMMUNITÉ
PATHOGÈNES



La Région

Lorraine



cnés

De l'Espace pour la Terre

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Fanny GAGNIER**

Modulation de l'immunité adaptative murine par la micropesanteur simulée, l'hypergravité ou les stress chroniques ultra légers

le 24 novembre 2014

Membres du jury :

Président :	M. Stéphane BLANC	Directeur de Recherche, Département Ecologie, Physiologie et Ethologie, IPHC, CNRS 7178, Université de Strasbourg
Rapporteurs :	M. Michel SALZET	Professeur, EA 4550-FRE 3637 CNRS, Laboratoire PRISM, Université de Lille 1
	M. David DUBAYLE	Maître de Conférences, HDR, Laboratoire de Neurophysiques et Physiologie, CNRS UMR 8119, Université Paris Descartes
Examineurs :	M. Jean-Pol FRIPPIAT	Professeur, EA 7300 Stress, Immunité, Pathogènes Université de Lorraine (directeur de thèse)
	Mme Christine LEGRAND-FROSSI	Maître de Conférences, EA 7300 Stress, Immunité, Pathogènes Université de Lorraine (co-encadrante de thèse)
Invitée :	Mme Guillemette GAUQUELIN-KOCH	Docteur, Responsable des Sciences de la Vie, CNES, Paris

À ma maman, ton soutien est mon énergie

REMERCIEMENTS

Durant ces trois années de thèse, de nombreuses personnes ont croisé ma route et ont participé à un moment ou à un autre à l'élaboration et à l'aboutissement de ce projet.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean-Pol Frippiat pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire et pour avoir encadré mon travail de thèse. Je remercie également le Docteur Christine Legrand-Frossi d'avoir accepté de co-encadrer ce travail.

Je remercie le Professeur Michel Salzet et le Docteur David Dubayle d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. J'adresse également toute ma gratitude envers les Docteurs Stéphane Blanc et Guillemette Gauquelin-Koch pour avoir accepté de participer à ce jury et d'examiner mon travail.

Je tiens également à remercier les Professeurs Éric Tschirhart et Annie Dary-Mouroit d'avoir accepté de participer au comité de suivi de thèse. Vos questions et vos conseils m'ont énormément apporté.

Je remercie la Région Lorraine, ma région natale, qui a accepté de cofinancer ma bourse de thèse et mon employeur, le Centre National d'Etudes Spatiales (CNES). Les travaux menés au cours de ces trois années ont été financés par le CNES, l'Université de Lorraine, la Région Lorraine, le Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et l'Agence Nationale de la Recherche.

Je remercie sincèrement Christine pour son encadrement, sa disponibilité et son soutien sans faille tout au long de ces années. Elle m'a formée à l'expérimentation animale et nous avons travaillé de nombreuses heures en "culture cell" toutes les deux. Je l'ai initiée la cytométrie en flux et elle m'a appris à rédiger et communiquer mes travaux. Je n'oublierai jamais nos discussions, scientifiques et personnelles, et nos failles "spatio-temporelles". Merci Christine, je te serai à jamais reconnaissante pour ta confiance, tes conseils et ta gentillesse.

Je remercie également Armelle grâce à qui j'ai eu l'opportunité de réaliser cette thèse et d'ainsi poursuivre la recherche en Immunologie avec les enseignants qui m'en ont donné envie au départ. Merci à Sandra pour ses conseils sur les réponses aux reviewers. Je remercie la "team Bio Mol", Guillaume et Stéphanie, pour leur aide technique et leur patience pour répondre à mes questions sur les qPCR avant que je ne sois rodée. Bon courage également à Coralie qui va commencer sa thèse avec pleins de projets en vue. Je remercie pareillement les membres de l'EA 7300 avec lesquels j'ai pu partager des manips, des conseils, des résultats ou encore des discussions scientifiques. Merci à Corentine et Janina en "bactério", Anne et Marie en "parasito", à Lucille, Hélène et Véronique en "viro", à Catherine en "neuro".

J'ai également une pensée pour Nathan et Véronique, qui étaient présents à mon arrivée et avec qui j'ai fait mes premières armes. Je ne peux plus écouter Coldplay sans penser à vous désormais ! Véro, ta gentillesse, ta bonne humeur et tes conseils scientifiques me manquent énormément. Nathan, la mission à Marseille avec Christine restera un super souvenir. Merci pour votre aide précieuse et votre amitié.

D'autres amitiés sont également nées et ont évolué dans et après le labo. Merci à Kévin, M2 reclus du troisième étage, pour nos discussions quand j'étais avec mes cellules en cytométrie. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse tourangelle. Promis je vais tenter de passer ! Nader, ta motivation et ta bonne humeur m'ont été d'un grand réconfort. Aurélie, ton assiduité et ton engagement resteront un modèle. Amandine, ta joie et ta persévérance m'ont impressionnée, mais ça ne me fera pas oublier que « je ne travaille pas, car je suis avec ma stagiaire et que tu peux donc me déranger » ! Bon courage pour la thèse bretonne. Marine, tu vas commencer ta thèse quand je la termine et pour cela je vais reprendre une de tes phrases fétiches, « ça va l'faire ! ». Merci encore pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Nassima, nous sommes arrivées quasiment en même temps voilà trois ans. Je vais partir mais je n'oublie pas nos délires et nos bons moments passés au labo et en dehors. Merci pour ta présence et ton amitié sans faille.

Je n'oublie pas Anne-Marie et Lisiane. Je vous remercie chaleureusement pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre écoute. Tout a commencé à l'étage quand j'allais voir Anne-Marie pendant la "cyto" et cela a continué de l'autre côté du labo. Ces pauses étaient de très bons moments de détente, surtout lors de la phase de rédaction. Merci pour votre présence et votre soutien.

J'ai une pensée particulière pour mes deux stagiaires préférées. Oriane, nous avons appris la bio mol' ensemble. Ce qui t'a permis de voir qu'en recherche il faut toujours persévérer. Laura, tu as eu plus de chance en arrivant l'année suivante. Grâce à toi le projet "hyperG" a énormément avancé. Les filles, votre travail était super et je vous souhaite le meilleur pour la suite ! Vous étiez mes premières stagiaires 'techniques' et j'ai adoré vous encadrer officieusement. Je vous remercie pour votre bonne humeur, votre motivation et tous nos fous rires.

Je remercie tout particulièrement Frédéric Massin pour ses conseils et sa disponibilité. J'adresse toute ma sympathie à Anne-Laure Leblanc pour son aide avec toutes les démarches animalières. Je remercie également Laurence Lanfumey et son équipe pour leur accueil lors de nos missions parisiennes pour le CUMS ; et merci à Emilien pour ses réponses et sa disponibilité. Merci également à Marc Jamon et Mickael Bojados pour leur aide lors de notre mission marseillaise après la centrifugation. Merci à Michèle Goodhardt et son équipe de m'avoir permis de travailler avec eux sur la lymphopoïèse. Enfin, je remercie Jean-Louis Merlin pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire le temps d'une expérimentation réalisée avec le soutien technique de Carole Ramacci.

Le doctorat, ce n'est pas que le laboratoire. Je remercie Jérémy pour m'avoir proposé d'intégrer le bureau de l'association A-Team of BioS. Tout le temps passé avec l'équipe, Antoine, Yoann, Amel et Mathilde, à organiser et planifier les événements resteront de super moments. Un souvenir tout particulier restera lorsqu'Amel et moi nous sommes rendues compte que nous étions voisines de palier. Merci au Bureau et au CA pour le soutien et l'évasion nécessaires en dehors du travail de thèse.

Une pensée aussi pour mes "collègues" du CNES ; Charlotte, Anna, Camille, Aurélia, Samuel ; avec qui j'ai partagé mon sujet et des discussions passionnantes lors des JC² à Toulouse.

Je remercie également Sophie, Olga, Aurore et Jacqueline. Nous avons fait les 180 secondes, mais notre amitié représente bien plus ! Miao, une grande amitié et de bonnes rigolades depuis les Doctoriales. Sophie, on en a fait du chemin depuis les Doctoriales et nous allons finir quasiment en même temps. Merci pour ta présence et ton amitié.

En dehors de la thèse sur Nancy, je voudrais remercier sincèrement mes girls. Depuis Tours nous ne nous sommes plus quittés et tous nos week-end parisiens ou orléanais m'ont permis de décompresser, m'évader et de passer de très bons moments. Merci ma Nono, pour nous inviter dans ta famille. Merci ma Lulu, pour ton soutien sans faille. Merci ma Liloo, votre accueil à toi et Juju sur Paris est toujours génialissime et ta gentillesse me remonte le moral à chaque fois. Un grand merci également à mes zigotos, Tiph et Mattéo. Vous êtes mes BFF et nos soirées m'ont permis de passer de très bons moments. Tiph, ta franchise et ton amitié sont inestimables. Mattéo, je sais que nous serons toujours là l'un pour l'autre, et c'est très important pour moi. A vous cinq, merci pour votre précieuse amitié.

En participant aux Doctoriales, j'ai rencontré Jonathan. La thèse nous a rapprochés et depuis nous ne nous sommes plus quittés. Merci à toi de m'avoir soutenue et d'être resté présent même en étant si loin. La page de la thèse se tourne mais ce ne sera qu'un nouveau chapitre pour nous deux.

Mes remerciements ne seraient pas complets sans ma famille. De retour dans ma région natale pour la thèse, j'ai pu passer de nombreux moments familiaux qui m'ont permis de recharger les batteries auprès des personnes que j'aime. Merci aux oncles et tantes pour vos questions et votre soutien. Je retiendrai particulièrement Patou qui voulait à tous prix savoir quand je soutiendrais. Merci aux cousins/cousines qui connaissent de près ou de loin le milieu des études supérieures. Délirer avec vous a permis de relativiser l'enjeu. Je remercie également mes grands-parents maternels et ma grand-mère paternelle pour leur soutien inconditionnel. J'ai une pensée émue pour mon grand-père qui nous a quittés il y a trois ans. Merci à tous car avec vous je me suis entraînée à expliquer ce que représente un travail de thèse et mon sujet de recherche.

Je finirai par remercier mes parents, ma sœur, mon frère et Uni. Du plus loin que je me souviens, mes parents ont toujours cru en moi. Vivi, Niko et moi formons un trio d'enfer, envers et contre tout. Et Uni me montre à chaque instant son amour inconditionnel.

Papa, papounet, tu m'as toujours soutenu dans mes études. Encore aujourd'hui tu essaies de suivre ce que je fais et tu m'apportes toujours l'aide nécessaire pile au bon moment.

Niko, lil' bro', je t'ai vu grandir ces dernières années et notre relation s'en est trouvée que plus forte. Je te remercie d'être le frère que tu es, toujours vif et intelligent. Tu comptes énormément pour moi.

Vivi, ma lil' sis', malgré la distance, nous sommes toujours aussi proches. Rien ni personne ne nous séparera. Nous partageons même Santorin désormais. Je te remercie d'être la sœur que tu es, toujours joyeuse et intelligente. Ta présence est très importante dans ma vie.

Maman, ma petite mamounette. Aucun mot ne sera assez fort pour te remercier de tout ce que tu as fait ces dernières années, pour tout ce que tu fais et ce que tu feras. Ton dévouement et tes encouragements sont inestimables, pour moi, pour nous trois. Tu es mon modèle, mon roc et mon réconfort.

Jamais je n'arrêterai de tout faire pour que vous soyez fiers de moi, tous les quatre. Je vous aime. Du plus profond de mon cœur, merci.

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre 1 : Introduction générale	1
Le système immunitaire	3
I. Les fonctions du système immunitaire.....	3
II. L'immunité innée.....	4
II.1. Les barrières physico-biochimiques.....	4
II.2. Les cellules de la lignée myéloïde.....	5
II.3. Les médiateurs solubles.....	6
II.4. La réponse inflammatoire locale.....	7
III. L'immunité adaptative.....	8
III.1. La lymphopoïèse T et B.....	8
III.2. L'activation des lymphocytes T.....	12
III.3. L'activation des lymphocytes B.....	13
Le stress et le système immunitaire	16
I. Le concept de stress en biologie	16
I.1. La définition du stress	16
I.2. Les différentes étapes de la réponse au stress	17
I.3. Les différents types de stress.....	20
II. Les effets du stress sur le système immunitaire	21
II.1. Les effets du stress sur l'immunité innée	21
II.2. Les effets du stress sur l'immunité adaptative	23
II.3. Les effets bénéfiques du stress sur le système immunitaire	24
Les missions spatiales	25
I. Les modifications environnementales	25
I.1. Les contraintes physiques et psychologiques	25
I.2. Les conséquences sur l'organisme.....	26
II. Les effets d'un séjour dans l'espace sur le système immunitaire.....	27
II.1. Les impacts sur l'immunité innée.....	28
II.2. Les impacts sur l'immunité adaptative.....	28
Le projet de recherche	30
I. Les modèles animaux	30
II. Les objectifs du travail	31
Chapitre 2 : Les effets de la suspension anti-orthostatique sur le système immunitaire adaptatif	33
Les effets de la micropesanteur simulée sur les lymphocytes de la rate	35
I. Introduction	35
II. Objectifs de l'étude	36
III. Matériels et méthodes	37
III.1. Suspension anti-orthostatique.....	37
III.2. Suivi des animaux et recueil des échantillons.....	38
III.3. Analyses des splénocytes par cytométrie en flux	38

III.4. Etude de la réponse lymphoproliférative par marquage au CFSE	39
III.5. Dosage des immunoglobulines, de la corticostérone et des cytokines	39
III.6. Analyses statistiques.....	40
IV. Résultats	40
IV.1. Evaluation de l'état de stress après 21 jours de suspension.....	40
IV.2. Concentrations en immunoglobulines sériques.....	42
IV.3. Populations de lymphocytes B et T dans la rate	42
IV.4. Réponse lymphoproliférative après stimulation mitogénique	44
IV.5. Concentrations des cytokines sériques et dans les surnageants	47
V. Discussion.....	48
Les effets de la suspension anti-orthostatique sur les lymphopoïèses B et T	53
I. Introduction	53
II. Objectifs de l'étude	54
III. Matériels et méthodes	54
III.1. Suspension anti-orthostatique.....	54
III.2. Suivi des animaux et recueil des échantillons.....	55
III.3. Analyses des cellules de la lignée B et T par cytométrie en flux	55
III.4. Etude de la réponse lymphoproliférative par marquage au CFSE	56
III.5. Dosage des immunoglobulines et de la corticostérone	56
III.6. Test de formation de colonies	56
III.7. Marquage intracellulaire de STAT5 phosphorylé.....	56
III.8. PCR quantitative	56
III.9. Analyses statistiques.....	57
IV. Résultats	57
IV.1. Evaluation de l'état de stress au cours de la suspension	57
IV.2. Concentrations en immunoglobulines sériques.....	58
IV.3. Architecture du fémur et cellules souches hématopoïétiques	59
IV.4. Lymphopoïèse B.....	59
IV.5. Lymphopoïèse T.....	60
IV.6. Populations de lymphocytes B et T dans la rate et réponses lymphoprolifératives.....	61
V. Discussion.....	62
Chapitre 3 : Les effets de l'hypergravité sur la réponse des lymphocytes B de la rate	67
Les effets de l'hypergravité sur les lymphocytes B après stimulation au LPS	69
I. Introduction	69
II. Objectifs de l'étude	71
III. Matériels et méthodes	72
III.1. Centrifugation à 2G.....	72
III.2. Suivi des animaux et recueil des échantillons biologiques	72
III.3. Tri des splénocytes avant ou après stimulation au LPS.....	73
III.4. Analyses transcriptomiques des lymphocytes B de la rate.....	73
III.4.1. Extraction des ARN.....	73
III.4.2. Transcription inverse.....	73
III.4.3. Puces à ADN	74
III.4.4. PCR quantitative en temps réel	74
III.5. Analyses statistiques.....	76

IV. Résultats	76
IV.1. Résultats de l'étude transcriptomique	76
IV.2. Effets de l'hypergravité sur la voie TLR-4 des lymphocytes B	78
IV.3. Effets de la stimulation au LPS sur la voie TLR-4 des LB à 1G ou à 2G	78
IV.4. Effets de l'hypergravité sur la réponse au LPS	80
V. Discussion	81

Chapitre 4 : Les effets de stress chroniques ultra légers sur le système immunitaire adaptatif..... 85

Les effets de stress chroniques ultra légers sur les lymphocytes de la rate 87

I. Introduction	87
II. Objectifs de l'étude	88
III. Matériels et méthodes	88
III.1. Stress chroniques ultra légers.....	88
III.2. Recueil des échantillons biologiques.....	89
III.3. Analyses des splénocytes par cytométrie en flux	89
III.4. Mesure de la réponse lymphoproliférative par MTS.....	90
III.5. Dosage des immunoglobulines, de la corticostérone et des cytokines	90
III.6. Tri des splénocytes avant ou après stimulation au LPS.....	90
III.7. Analyses transcriptomiques des splénocytes dépourvus de LB.....	91
III.7.1. Extraction des ARN.....	91
III.7.2. Transcription inverse.....	91
III.7.3. PCR quantitative en temps réel	91
III.8. Analyses statistiques.....	92
IV. Résultats	92
IV.1. Evaluation de l'état de stress.....	92
IV.2. Concentrations en immunoglobulines sériques.....	92
IV.3. Concentrations en cytokines sériques	93
IV.4. Populations de lymphocytes B et T dans la rate	93
IV.5. Réponse lymphoproliférative et cytokines sécrétées après stimulation mitogénique	94
IV.6. Expression relative des transcrits d'IL-1 β et IL-6 dans les splénocytes	96
IV.7. Expression relative des transcrits de Fas et FasL dans les splénocytes.....	96
V. Discussion.....	97

Chapitre 5 : Conclusion 101

Discussion générale et perspectives 103

Intérêt sociétal et contremesures 110

Chapitre 6 : Publications 115

Publication n°1 : PLoS ONE, 2014 117

Publication n°2 : FASEB Journal, sous presse 133

Références Bibliographiques 163

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 :	Schéma du système immunitaire représentant le Soi et le Non Soi.	3
Figure 2 :	Différenciation de la lignée myéloïde.	5
Figure 3 :	Etapes de la lymphopoïèse T.	9
Figure 4 :	Structure d'un TCR $\alpha\beta$	9
Figure 5 :	Etapes de la lymphopoïèse B.	11
Figure 6 :	Structure d'un BCR.	11
Figure 7 :	Activation des Lymphocytes B par les antigènes T-indépendants et T-dépendants dans la rate.	14
Figure 8 :	TLR-4 et transduction du signal.	15
Figure 9 :	Schéma de la réponse au stress par le SNS et l'axe HPA.	19
Figure 10 :	Effets d'une mission spatiale sur l'organisme.	27
Figure 11 :	Photographie des souris isolées pour l'étude avec le modèle de micropesanteur simulée.	37
Figure 12 :	Évolution de la masse corporelle durant les 21 jours d'expérimentation.	41
Figure 13 :	Concentrations en corticostérone sérique après 21 jours d'expérimentation.	41
Figure 14 :	Concentrations des trois principaux isotypes d'immunoglobulines sériques après 21 jours d'expérimentation.	42
Figure 15 :	Exemple d'étude des lymphocytes spléniques à partir des tracés de densité obtenus par cytométrie en flux.	43
Figure 16 :	Phénotypes des lymphocytes spléniques après 21 jours d'expérimentation.	43
Figure 17 :	Exemple de profil des phénotypes lymphocytaires après 72 h de stimulation <i>in vitro</i> avec ou sans mitogène.	44
Figure 18 :	Etude des divisions lymphocytaires, par marquage au CFSE, après 72 h de stimulation <i>in vitro</i> avec un mitogène (LPS ou ConA).	46
Figure 19 :	Pourcentages de lymphocytes ayant proliférés après 72 h de stimulation mitogénique <i>in vitro</i>	47
Figure 20 :	Photographie d'une cage en polycarbonate équipée pour la suspension anti-orthostatique murine.	55
Figure 21 :	Évolution de la masse corporelle durant la suspension.	57
Figure 22 :	Évolution des masses relatives des organes lymphoïdes durant la suspension. ..	58
Figure 23 :	Évolution de la concentration en corticostérone sérique durant la suspension. ..	58
Figure 24 :	Évolution de la concentration des trois principaux isotypes d'immunoglobulines sériques durant la suspension.	58
Figure 25 :	Exemple d'étude des différents types de thymocytes à partir des tracés de densité obtenus par cytométrie en flux.	60
Figure 26 :	Évolution des populations de thymocytes durant la suspension.	61
Figure 27 :	Évolution du nombre de cellules nucléées et des populations lymphocytaires spléniques durant la suspension.	61

Figure 28 : Évolution du pourcentage de lymphocytes ayant proliféré après 72 h de stimulation mitogénique <i>in vitro</i> .	62
Figure 29 : Voies MyD88-dépendante et MyD88-indépendante du TLR-4.	71
Figure 30 : Photographie de la centrifugeuse à grand rayon utilisée pour réaliser les expérimentations à 2G.	72
Figure 31 : Schéma des résultats de l'étude de la voie TLR-4 par puces à ADN.	77
Figure 32 : Effets de l'hypergravité sur l'expression des gènes de la voie TLR-4.	78
Figure 33 : Effets de la stimulation au LPS sur la voie TLR-4 à 1G ou à 2G.	79
Figure 34 : Effets de l'hypergravité sur la réponse au LPS.	80
Figure 35 : Concentrations des trois principaux isotypes d'immunoglobulines sériques après 21 jours d'expérimentation.	93
Figure 36 : Concentrations en cytokines sériques après 21 jours de CUMS.	93
Figure 37 : Phénotypes des lymphocytes spléniques après 21 jours de CUMS.	94
Figure 38 : Indices de prolifération après 48 h de stimulation <i>in vitro</i> .	94
Figure 39 : Cytokines sécrétées par les lymphocytes spléniques stimulés par du LPS.	95
Figure 40 : Cytokines sécrétées par les lymphocytes spléniques stimulés par de la ConA.	95
Figure 41 : Expression relative des transcrits de l'IL-1 β et de l'IL-6 dans les cellules spléniques dépourvues de LB.	96
Figure 42 : Expression relative des transcrits de Fas et FasL dans les cellules spléniques dépourvues de LB.	97
Tableau 1 : Gain de masse, masses relatives des organes lymphoïdes et cellularité splénique après 21 jours d'expérimentation.	41
Tableau 2 : Nombres absolus de lymphocytes totaux et des sous-populations lymphocytaires dans la rate après 21 jours d'expérimentation ($\times 10^6$).	44
Tableau 3 : Variations des populations lymphocytaires après 72 h de stimulation mitogénique <i>in vitro</i> (%).	45
Tableau 4 : Séquences des oligonucléotides utilisées pour amplifier les ADNc des gènes de référence.	75
Tableau 5 : Séquences des oligonucléotides utilisées pour quantifier les ADNc codant des protéines de la voie TLR-4 des LB spléniques avant ou après stimulation <i>in vitro</i> au LPS.	76
Tableau 6 : Protocole de stress chroniques ultra légers (CUMS).	89
Tableau 7 : Séquences des oligonucléotides utilisées pour quantifier les ADNc des gènes d'intérêt.	91
Tableau 8 : Concentrations en corticostérone sérique, masses relatives des organes lymphoïdes et cellularité splénique après 21 jours de CUMS.	92
Tableau 9 : Principaux résultats obtenus concernant l'impact des trois modèles utilisés sur le système immunitaire adaptatif murin.	104

ABRÉVIATIONS

De nombreux termes en anglais, couramment utilisés et difficiles à traduire sans en dénaturer le sens, sont écrits en italiques.

ACTH	H ormone A dréno c ortico t rophine
ADN	Acide D ésoxyribo n ucléique
ADNc	Acide D ésoxyribo n ucléique c omplémentaire
APC	<i>Allophycocyanin</i>
ARN	Acide R ibo n ucléique
ARNm	Acide R ibo n ucléique m essenger
BCR	R écepteur des C ellules B
CD	C luster de D ifférenciation
CFSE	<i>CarboxyFluorescein SuccinimidylEster</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CLP	P rogéniteurs lymphoïdes c ommuns
CMH	C omplexe M ajeur d' H istocompatibilité
CMS	<i>Chronic Mild Stress</i> = Stress Chroniques Légers
ConA	C oncanavaline A
CPAg	C ellule P rése n tratrice d' A ntigène
CRH	<i>Corticotropin-Releasing Hormone</i> = Corticolibérine
CSH	C ellule S ouche H ématopoïétique
CUMS	<i>Chronic Ultra Mild Stress</i> = Stress Chroniques Ultra Légers
DMSO	D iméthylsulfoxyde
dNTP	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
DN	D ouble N égative
DP	D ouble P ositive
DO	D ensité O ptique
DTT	<i>Dithiothréitol</i>
ECD	<i>Phycoerythrin-Texas Red Conjugate</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
Epo-GF	<i>Erythropoietin-Growth Factor</i>
ESM	E rreur standard à la m oyenne
Fc	F ragment c onstant
HPA	<i>Hypothalamic-Pituitary-Adrenal</i> = Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien
IFN	I nterféron
Ig	I mmunoglobuline

IKK	<i>IκB Kinase</i>
IL	Interleukine
IP	Indice de P rolifération
LB	Lymphocyte B
LMPP	Progéniteurs Lymphoïdes " M arqués"
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTc	Lymphocyte T cytotoxique (LT CD8 ⁺)
LTh1	Lymphocyte T helper type 1 (LT CD4 ⁺ auxiliaire de type 1)
LTh2	Lymphocyte T helper type 2 (LT CD4 ⁺ auxiliaire de type 2)
LTh17	Lymphocyte T helper type 17 (LT CD4 ⁺ auxiliaire de type 17)
LTreg	Lymphocyte T régulateur (LT CD4 ⁺ auxiliaire de type régulateur)
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MPP	Progéniteurs M ultipotents
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
NH₄Cl	Chlorure d'ammonium
NK	<i>Natural Killer</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> = motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PE-Cy7	<i>Phycoerythrin-Cyanine 7</i>
PRR	<i>Pathogen Recognition Receptor</i> = récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
qPCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> quantitative en temps réel
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNase	Ribonucléase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i> = facteur de croissance des cellules souches
SNC	Système Nerveux Central
SNS	Système Nerveux Sympathique
SP	Simple P ositive
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TCR	Récepteur des Cellules T
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

Noms des gènes mentionnés :

AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
E2A	<i>Early region 2A</i>
EBF	<i>Early B cell Factor</i>
Eef2	<i>Elongation factor 2</i>
Eif3f	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F</i>
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
Fas	<i>Apoptosis Stimulating Fragment</i>
FasL	Ligand de Fas
Fos	<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Irak4	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 4</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase = Mitogen-activated protein kinase 8</i>
Map3k7ip2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 binding protein 2</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
p38	<i>Mitogen-activated protein kinase 12 (= Mapk12)</i>
PAX5	<i>Paired box 5</i>
Ppia	<i>Peptidylpropyl isomerase A</i>
RIP1	<i>Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>
Rpl13	<i>Ribosomal Protein L 13</i>
STAT-5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
Tirap	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
Traf6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
Tram	<i>Toll-like receptor adaptor molecule 2</i>
Trif	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

Le système immunitaire

I. Les fonctions du système immunitaire

L'immunité correspond à l'ensemble des mécanismes biologiques qui permettent à un organisme de maintenir son intégrité. Le système immunitaire est composé d'un ensemble de cellules et de molécules qui assurent la défense de l'organisme lorsqu'il perçoit une menace. Celle-ci peut être externe lorsqu'il s'agit de substances étrangères ou d'agents infectieux, comme les microorganismes pathogènes ; ou interne, lorsque les propres constituants de l'organisme s'altèrent, comme les cellules tumorales. Pour ce faire, il doit apprendre à reconnaître et à tolérer ce qui lui appartient, le Soi, et à reconnaître et à rejeter ce qui lui est étranger, le Non Soi (**Figure 1**).

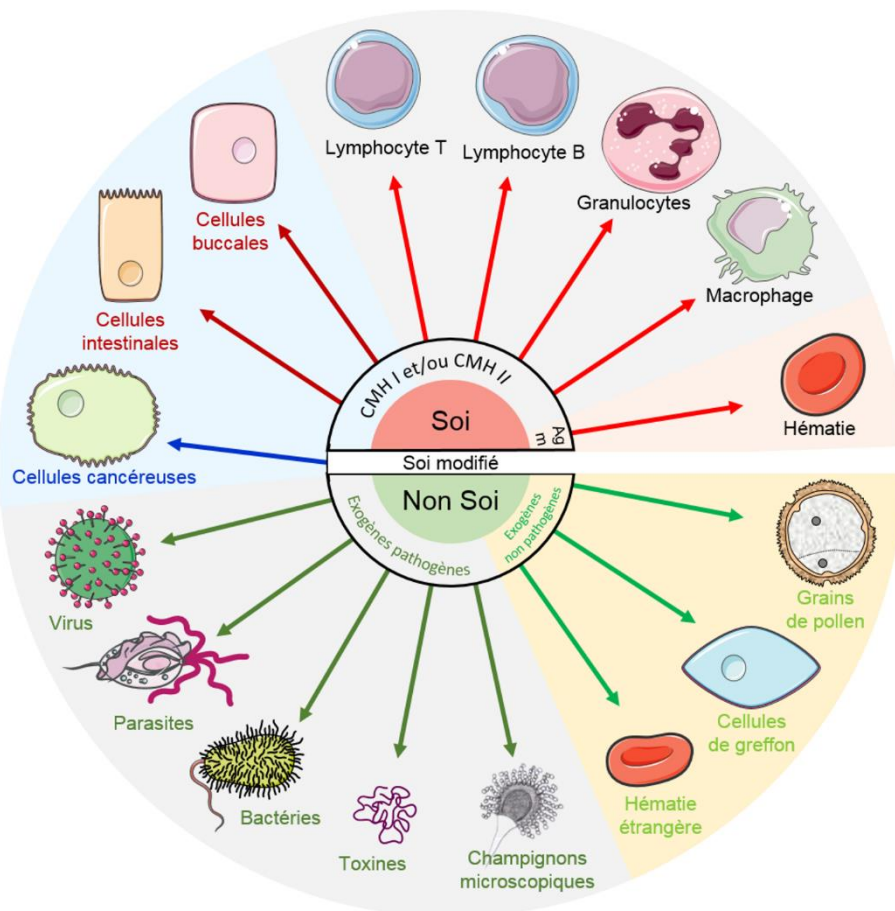


Figure 1 : Schéma du système immunitaire représentant le Soi et le Non Soi. Le système immunitaire défend l'organisme en reconnaissant et tolérant les éléments qui lui appartiennent (Soi) et en rejetant les éléments étrangers (Non Soi). Schéma réalisé avec les images de Servier Medical Art.

Le système immunitaire est donc en mesure de reconnaître et de différencier les molécules étrangères à l'hôte, aussi appelées antigènes, qui sont associées à des menaces microbiennes ou à du Soi modifié [1]. Au cours de l'évolution, deux types d'immunité se sont développés : tout

d'abord l'immunité innée, dite aussi naturelle ou non spécifique, puis l'immunité adaptative, appelée également acquise ou spécifique. L'immunité innée, d'action immédiate, fait intervenir principalement des molécules et des cellules cytotoxiques. Elle permet entre autre de reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), communs à de nombreux microorganismes et très conservés au cours de l'évolution, grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) qui sont présents à la surface des cellules du système immunitaire. Lorsque cette réponse n'est pas suffisante, l'immunité adaptative se développe après quelques jours. Elle repose sur la reconnaissance précise de l'antigène qui permet d'adapter la réponse à la nature de celui-ci, un parasite, un virus, une cellule tumorale ou encore une bactérie, par exemple. De plus, la persistance de quelques cellules mémoires spécifiques de cet antigène après son élimination permet une réponse plus efficace lors d'une rencontre ultérieure avec ce même antigène [1]. Chez les Vertébrés, l'immunité innée et l'immunité adaptative sont étroitement liées. En effet, l'immunité innée est indispensable à l'activation de l'immunité adaptative et en retour les constituants de l'immunité adaptative cellulaire et humorale améliorent les performances de l'immunité innée.

II. L'immunité innée

L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme contre les infections. Elle va reconnaître les molécules du Non Soi et agir de manière indépendante de la nature précise de l'antigène, ce qui lui confère une certaine polyvalence. Ses constituants existent avant tout contact avec l'antigène et a donc une mise en œuvre immédiate. Son mode d'action reste le même quel que soit l'agent infectieux rencontré (virus, bactérie ou parasite) : la phagocytose, entretenue par la réaction inflammatoire. Par contre, elle ne s'améliore pas lors de contacts répétés avec le même pathogène. Cette immunité est assurée par plusieurs constituants cellulaires et moléculaires de l'organisme.

II.1. Les barrières physico-biochimiques

Les premiers obstacles rencontrés par un pathogène sont les barrières anatomiques. Ces dernières sont constituées de cellules épithéliales qui bordent les différents tissus : peau, muqueuses (tractus respiratoire, gastro-intestinal...). Elles sont efficaces pour empêcher le passage des pathogènes vers les tissus cibles. Les cellules épithéliales produisent des médiateurs solubles qui inhibent la croissance et détruisent parfois les microorganismes, comme par exemple le lysozyme présent dans la salive qui va hydrolyser les glycosaminoglycanes

constituant la paroi des bactéries à Gram+. Le tractus gastro-intestinal quant à lui, possède un pH acide et l'estomac contient des enzymes digestives et des sels biliaires pour éliminer les microorganismes pathogènes [2].

II.2. Les cellules de la lignée myéloïde

Cette lignée intervient principalement dans les réponses immunitaires innées. Ces cellules, des leucocytes aussi appelés globules blancs, ont pour fonction d'éliminer les substances/particules étrangères à l'organisme en les phagocytant ou en les lysant. Certaines d'entre elles peuvent aussi enclencher une réponse immunitaire adaptative en présentant des antigènes aux lymphocytes T. Elles dérivent toutes d'une cellule souche hématopoïétique qui se différencie en un progéniteur hématopoïétique commun situé dans la moelle osseuse, le progéniteur myéloïde, qui se multiplie et se différencie en plusieurs sous-populations, les granulocytes, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (**Figure 2**).

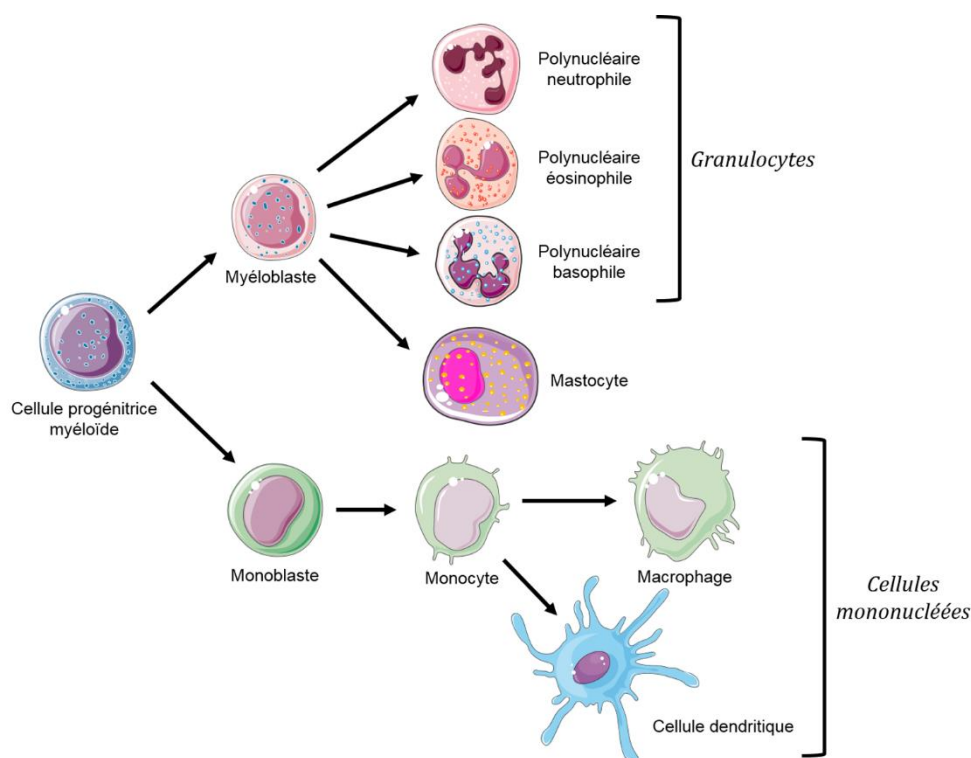


Figure 2 : Différenciation de la lignée myéloïde. Le progéniteur myéloïde va se différencier soit en myéloblaste soit en monoblaste. Les myéloblastes se différencient en granulocytes circulants, dont font partie les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles, et en mastocytes dans les tissus. Les monoblastes vont devenir des monocytes se différenciant en macrophages dans les tissus ou en cellules dendritiques. *Schéma réalisé avec les images de Servier Medical Art.*

Les granulocytes sont composés de trois types cellulaires représentant 60 à 70% des leucocytes sanguins. Ils sont identifiés grâce à la présence de granules dans leur cytoplasme. Les neutrophiles sont les granulocytes les plus nombreux dans le sang (90%) et ont une courte

durée de vie. Ils vont migrer par chimiotactisme vers le lieu de l'infection afin d'y phagocyter et digérer toute substance/particule étrangère, principalement les bactéries. Les éosinophiles représentent seulement 2 à 5% des leucocytes sanguins, mais sont plus nombreux dans les tissus. Ils vont majoritairement entraîner la lyse des agents pathogènes par libération d'enzymes même s'ils sont capables de phagocyter. Ils sont également impliqués dans les réponses d'hypersensibilité, *via* leurs récepteurs pour les parties Fc des IgE. Les basophiles sont très rares dans le sang (0,5% des leucocytes circulants). Ils sont impliqués majoritairement dans l'activation de l'inflammation et les allergies à IgE. Les mastocytes qui se trouvent dans les tissus possèdent les mêmes fonctions.

La seconde population est un ensemble de cellules composant le système phagocytaire mononucléé ou encore système réticulo-histiocytaire. Les monocytes circulants ont une durée de vie courte et peuvent devenir adhérents après activation. Lorsqu'ils entrent dans un tissu, ils deviennent alors des macrophages et acquièrent les caractéristiques du tissu. Leur fonction principale est la phagocytose, mais ils effectuent aussi la cytolyse et sécrètent des médiateurs solubles tels que des protéines du complément, des enzymes et des cytokines. Enfin, ils peuvent présenter aux lymphocytes T auxiliaires un antigène phagocyté [2]. Le second type cellulaire correspond à des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPAg). Leur fonction principale est de présenter des parties d'antigènes aux lymphocytes T auxiliaires. Pour cela, elles doivent d'abord internaliser et digérer l'antigène. Ce sont les cellules dendritiques folliculaires (à l'intérieur des follicules des organes lymphoïdes), les cellules de Langerhans (dans la peau et les muqueuses) ou encore les cellules interdigitées (dans le thymus).

II.3. Les médiateurs solubles

Ces médiateurs solubles ont pour fonction d'attirer puis d'activer les cellules de l'immunité innée sur le site de l'infection ou de participer directement à l'élimination du pathogène. Il s'agit de chimiokines, de cytokines, des protéines de la phase aiguë et du système du complément.

Les chimiokines sécrétées par les cellules activées par la présence de microorganismes vont attirer de nouvelles cellules à partir du sang sur le site de l'infection. Des cytokines vont alors renforcer l'activation des cellules effectrices pour enclencher la phagocytose ou la dégranulation par exemple. Les protéines de la phase aiguë sont sécrétées en grande quantité lors d'une infection. Elles facilitent la fixation des molécules du complément sur les éléments pathogènes et donc favorisent l'élimination rapide du pathogène. Les protéines du complément sont naturellement présentes dans le sang sous forme de proenzymes. Elles peuvent être activées

directement par certains microorganismes, dans le cadre de la voie alterne et de celle des lectines, ou par la présence de complexes antigène-anticorps, dans le cadre de la voie classique. Ces voies aboutissent à : (i) la lyse de la paroi des bactéries à Gram-, (ii) l'opsonisation, ou recouvrement, des microorganismes pathogènes, (iii) le chimiotactisme qui va attirer les phagocytes et (iv) l'augmentation du flux sanguin et de la perméabilité des vaisseaux sanguins à proximité des sites infectés. Dans le cas d'infection virale, les interférons (IFN) α et β , ou interférons de type I, sont des cytokines sécrétées par les cellules infectées qui aident les cellules saines aux alentours à résister à la contamination virale.

II.4. La réponse inflammatoire locale

Lorsque des microorganismes passent les barrières physico-chimiques de la peau ou des muqueuses et pénètrent dans les tissus, ils déclenchent l'activation du complément et des cellules du système immunitaire déjà sur le site. La libération au niveau de la zone infectée des fragments C5a ou C3a du complément et de molécules telles que l'histamine, les prostaglandines et les leucotriènes, sécrétées par les mastocytes, augmente alors la perméabilité des vaisseaux sanguins à proximité et l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales de ces vaisseaux. Les phagocytes, attirés par ces molécules du complément, peuvent alors traverser la paroi du vaisseau sanguin pour rejoindre les zones infectées par diapédèse. Le chimiotactisme est renforcé par la sécrétion de chimiokines, comme l'interleukine 8 (IL-8), par les macrophages.

Les cellules phagocytaires, possédant des récepteurs de molécules du complément et des parties Fc des immunoglobulines, peuvent se déplacer à la rencontre d'une particule étrangère recouverte par des anticorps ou par des fragments C3b, libérés par l'activation du complément, pour la capter puis la détruire par lyse ou phagocytose. De plus, les motifs communs à un grand nombre de microorganismes, les PAMPS, peuvent être reconnus par des récepteurs présents à la surface des cellules phagocytaires, les PRRs et les Toll-Like Receptor (TLR).

Des cytokines, comme l'IL-1 β , le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) et l'IL-6, qui sont sécrétées par les cellules présentes dans le tissu lésé ou infecté, vont stimuler cette réponse inflammatoire. Elles peuvent aussi agir à distance dans d'autres organes tels que le foie, pour stimuler la production des protéines de la phase aigüe, et le système nerveux central (SNC) pour déclencher notamment l'augmentation de la température corporelle. Ces cytokines, dites pro-inflammatoires, peuvent aussi, en retour, réguler cette réponse inflammatoire en induisant la production de neurotransmetteurs et d'hormones telles que les glucocorticoïdes qui auront un effet immunosuppresseur.

III. L'immunité adaptative

La réponse immunitaire innée n'est pas toujours efficace, lorsque par exemple les microorganismes sont très nombreux, ou très virulents, ou qu'ils échappent aux mécanismes de défense de l'immunité innée. C'est alors l'immunité adaptative qui va entrer en jeu en faisant appel à des médiateurs cellulaires particuliers : les lymphocytes T et B, capables de développer des réactions plus adaptées à la nature du pathogène. Cette immunité est donc spécifique de l'agent infectieux. Elle nécessite une reconnaissance préalable de celui-ci, qui induit une phase de latence lors de la réponse "primaire", c'est-à-dire de la première rencontre avec l'antigène. De plus, l'immunité adaptative va permettre de conserver cet antigène en mémoire grâce à la persistance de lymphocytes spécifiques de celui-ci après son élimination. Une infection ultérieure entraînera alors une réponse plus rapide et plus intense, appelée réaction "anamnésique" ou réponse "secondaire".

III.1. La lymphopoïèse T et B

Chez les mammifères, le système lymphoïde est composé d'organes lymphoïdes primaires (foie fœtal, moelle osseuse et thymus) et secondaires (rate, ganglions lymphatiques et tissu lymphoïde associé aux muqueuses) contenant des cellules telles que les lymphocytes et les cellules spécialisées dans la présentation des antigènes (CPAg). Les organes primaires permettent la maturation et la sélection des lymphocytes présentant chacun un récepteur d'antigène à leur surface. Les organes lymphoïdes secondaires sont le lieu de rencontre des antigènes avec les lymphocytes et le siège de l'activation et de la multiplication de ces derniers. A l'issue de cette activation, les lymphocytes T et B spécifiques de l'antigène vont acquérir des fonctions effectrices qui, à terme, permettront le plus souvent l'élimination de l'antigène.

Au cours de la lymphopoïèse, des cellules souches hématopoïétiques (CSH) se différencient en progéniteurs multipotents pour devenir des progéniteurs lymphoïdes communs dans la moelle osseuse qui, ensuite, pourront s'engager dans la voie des cellules T, B ou Natural Killer (NK). Des progéniteurs multipotents (MPP) vont rejoindre le thymus où ils subiront une maturation progressive au contact des cellules du stroma dans le cortex (**Figure 3**). Celle-ci est caractérisée par les changements progressifs d'activité des gènes aboutissant à l'expression du récepteur de l'antigène, le TCR (T Cell Receptor), et de marqueurs protéiques tels que CD3, CD4 et CD8. Ces changements reflètent le degré de maturation des thymocytes. Le facteur de transcription Ikaros est nécessaire pour la formation des progéniteurs T et NK, tandis que Notch-1, Pax5, GATA3 et IL-7R α sont impliqués dans la différenciation de la lignée T [3]. Les

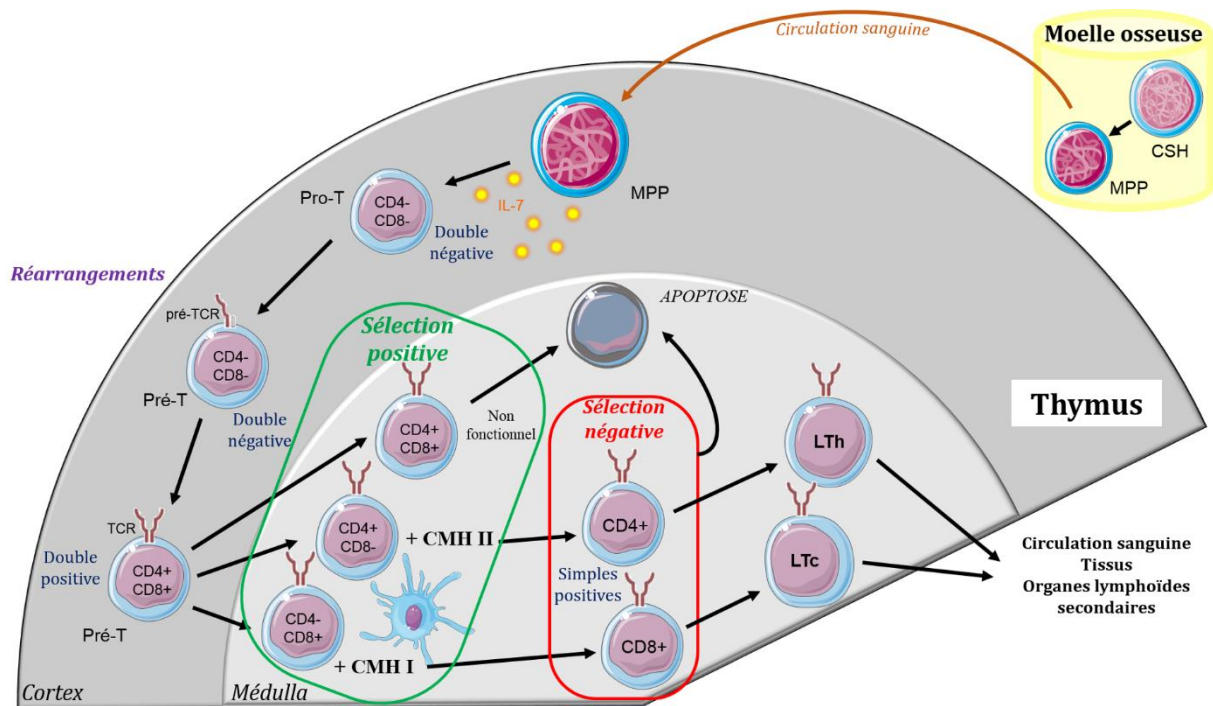


Figure 3 : Étapes de la lymphopoïèse T. Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) vont se différencier en progéniteurs multipotents (MPP). Ces cellules vont migrer vers le thymus pour se multiplier et acquérir le récepteur d'antigène des cellules T (TCR) associé au CD3 et subir la sélection positive, sélectionnant les cellules reconnaissant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ; puis négative, éliminant les cellules reconnaissant des molécules du Soi. Les lymphocytes T (LT) matures vont ensuite migrer vers les tissus et les organes lymphoïdes secondaires à la rencontre de leur antigène spécifique. *Schéma réalisé avec les images de Servier Medical Art.*

progéniteurs de cette lignée, les cellules pro-T, vont tout d'abord se multiplier dans la zone corticale du thymus, sans exprimer ni CD4 ni CD8, à ce stade de différenciation elles sont appelées double-négatives (DN). Elles vont tout d'abord donner naissance à une lignée minoritaire, les T $\gamma\delta$, dont le TCR est constitué d'une chaîne γ et d'une chaîne δ non associées aux molécules CD4 ou CD8. Puis la population majoritaire, les T $\alpha\beta$, va ensuite se développer. Leur TCR est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β qui sera associée aux molécules CD4 et CD8 (**Figure 4**). La partie N-terminale extracellulaire du TCR sera complémentaire d'une fraction de molécule étrangère à l'organisme, donc d'un antigène, et la partie C-terminale intra-

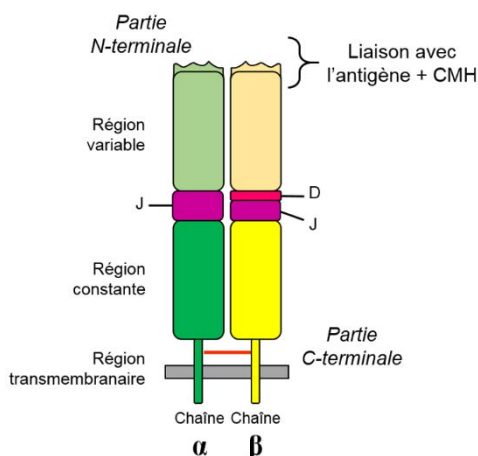


Figure 4 : Structure d'un TCR $\alpha\beta$. Les chaînes α et β sont composées chacune d'une région variable et d'une région constante. Le segment de diversité (D) est présent uniquement sur la chaîne β tandis que le segment de jonction (J) est présent sur les deux chaînes. Le pont disulfure est représenté par un trait orange. La structure d'un TCR $\gamma\delta$ est similaire, avec la chaîne γ correspondant à la chaîne α et la chaîne δ à la chaîne β .

cytoplasmique sera associée aux molécules du complexe CD3 qui assurera la transduction du signal. Une très grande diversité de TCR sera produite grâce aux réarrangements des gènes V(D)J codant les différentes parties du récepteur qui ont lieu au cours de la maturation des LT dans le thymus. Ce large répertoire de lymphocytes T, chacun exprimant un seul type de TCR, permettra à l'organisme de répondre à un très grand panel d'antigènes. Les TCR de type $\alpha\beta$ reconnaissent les antigènes lorsque ceux-ci ont été apprêtés par une cellule, sous forme de peptide associé à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présente à la surface des cellules de l'hôte. C'est pourquoi seules les cellules pré-T dont le pré-TCR a une affinité pour une molécule du CMH présentée par les cellules épithéliales du thymus pourront poursuivre leur maturation, les autres, environ 95%, seront éliminées par apoptose (**Figure 3**). Ce mécanisme est appelé « sélection positive ». A ce stade les pré-T expriment aussi les marqueurs CD4 et CD8, elles sont appelées double positives (DP). Enfin, après plusieurs divisions, ces cellules DP termineront leur maturation au niveau de la zone médullaire de l'organe, en exprimant de forts taux de TCR associé à un seul type de co-récepteur, CD4 ou CD8. Les cellules DP reconnaissant une molécule du CMH de classe I vont devenir simple positives (SP) $CD8^+$ et constitueront la population de lymphocyte T cytotoxiques. Les cellules DP reconnaissant une molécule du CMH de classe II deviennent des SP $CD4^+$, qui constitueront la population de lymphocyte T auxiliaires. De plus, les cellules reconnaissant les antigènes de l'hôte, ou molécules du Soi, seront éliminées par apoptose lors de la « sélection négative ». Ces lymphocytes T matures (SP) quitteront progressivement le thymus par la circulation sanguine pour rejoindre les tissus ou les organes lymphoïdes secondaires où ils rencontreront leur antigène. Environ 2% des cellules T seulement survivront à cette double sélection.

La maturation des lymphocytes B (LB) a lieu dans le foie fœtal ou la moelle osseuse après la naissance à partir de CSH (**Figure 5**). Au cours de celle-ci, les CSH donnent naissance à des progéniteurs multipotents (MPP), puis aux progéniteurs lymphoïdes "marqués" (LMPP) et lymphoïdes communs (CLP). L'engagement dans la lignée B est contrôlé par les facteurs de transcription E2A, Ebf et Pax5 [4]. De plus, l'IL-7 joue un rôle crucial dans la différenciation des cellules B [5]. Les premières étapes de maturation des cellules B se font en association étroite avec les cellules stromales situées sous l'endosteum et débutent par le réarrangement des gènes V(D)J codant le récepteur de l'antigène (BCR). Celui-ci est une immunoglobuline membranaire constituée de deux chaînes lourdes (H) et de deux chaînes légères (L) associées entre elles par des ponts disulfures (**Figure 6**). Les parties N-terminales extracellulaires, qui correspondent au paratope, sont complémentaires de l'antigène et les parties C-terminales intra-

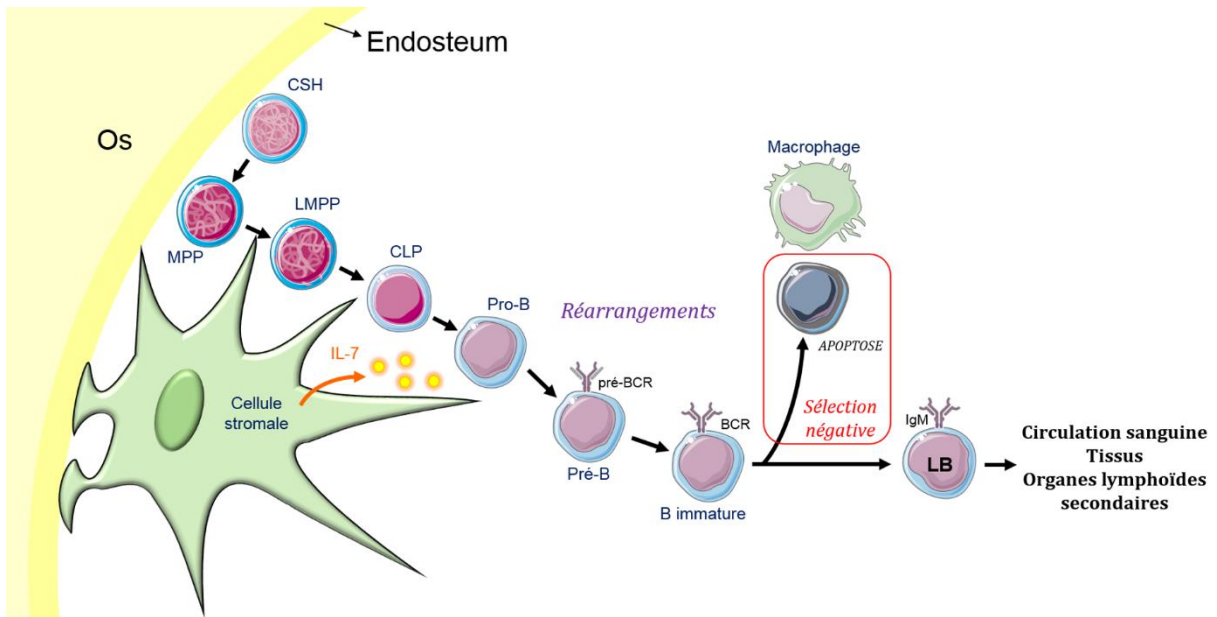


Figure 5 : Étapes de la lymphopoïèse B. Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) vont se différencier en progéniteurs multipotents (MPP) puis en progéniteurs lymphoïdes marqués (LMPP) et ensuite en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Les cellules pro-B engagées dans la lignée B vont rester dans la moelle osseuse et acquérir le récepteur d'antigène des cellules B (BCR). Après sélection négative, les lymphocytes B (LB) vont migrer vers les tissus et les organes lymphoïdes secondaires à la rencontre de leur antigène spécifique. Schéma réalisé avec les images de Servier Medical Art.

cytoplasmiques sont associées aux molécules responsables de la transduction du signal, comme par exemple CD79 α , CD79 β et CD19. Comme pour les lymphocytes T, une très grande diversité de BCR peut être produite grâce aux mécanismes de réarrangement. Ceux-ci se font dans un ordre précis qui permet de définir le degré de maturité de la cellule B (**Figure 5**). Ce sont tout d'abord les gènes codant les chaînes lourdes qui se réarrangent, au stade pro-B, pour aboutir à l'expression d'une chaîne μ . Puis ceux des chaînes légères se réarrangent à leur tour, au stade pré-B. A chaque étape les cellules se multiplient, permettant ainsi d'augmenter la diversité du répertoire, et progressent vers la cavité médullaire. Enfin, les B immatures, exprimant une IgM à leur surface sont sélectionnés négativement, afin d'éliminer par apoptose

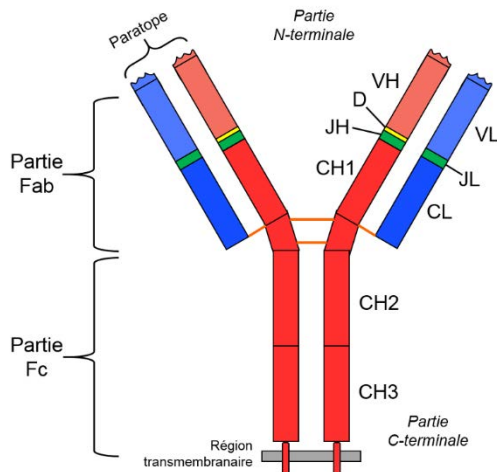


Figure 6 : Structure d'un BCR. Les chaînes lourdes (H) sont représentées en rouge. Les chaînes légères (L) sont en bleu. Les domaines variables (V) et constants (C) permettent d'identifier les parties Fab (fragment antigène binding) et Fc (fragment constant). Le segment de diversité (D) est présent uniquement sur les chaînes lourdes tandis que le segment de jonction (J) est présent sur les chaînes lourdes et légères. Les ponts disulfures sont représentés par des traits orange. Les divers isotypes d'immunoglobulines se différencient par la nature des domaines CH qui composent la chaîne lourde.

toutes les cellules pour lesquelles le BCR aurait une affinité pour une molécule du Soi. Les LB immatures continuent leur différenciation en lymphocytes B matures exprimant une IgM et une IgD spécifique d'un antigène, puis passent dans la circulation sanguine et se rendent dans les organes lymphoïdes secondaires où ils pourront rencontrer leur antigène.

III.2. L'activation des lymphocytes T

L'activation des lymphocytes T (LT), d'une part les LT auxiliaires ou *helper* CD4⁺ (LTh) et d'autre part les LT cytotoxiques CD8⁺ (LTc), se fait au sein des organes lymphoïdes secondaires en association avec des cellules présentatrices d'antigène (CPAg) exprimant à leur surface des molécules du CMH. Les LTh reconnaissent les antigènes présentés sous forme d'un peptide exogène par les molécules du CMH de classe II exprimées à la surface d'une CPAg. Les LTc reconnaissent les antigènes sous forme d'un peptide endogène *via* des molécules du CMH de classe I exprimées à la surface de CPAg, de cellules tumorales ou infectées par un pathogène intracellulaire [1]. Cette reconnaissance doit être accompagnée de signaux de co-stimulation provenant de la CPAg.

Une fois activés, les LTh ont pour rôle d'adapter la réponse immunitaire primaire à la nature de l'antigène. En effet, ils agissent en libérant des cytokines qui permettent la communication entre les différentes cellules du système immunitaire, en véhiculant des signaux de croissance, de différenciation et d'activation. C'est le type de cytokines libérées qui orientera la réponse vers celle qui sera la plus appropriée à l'élimination du pathogène. Si le pathogène est intracellulaire (virus, bactérie ou parasite par exemple), les LTh vont se différencier en lymphocytes Th1 sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN γ , qui vont stimuler une réponse à médiation cellulaire avec comme effecteurs principaux les LTc, les cellules dendritiques, les cellules NK et les macrophages activés. Les LB ayant eu aussi reconnu l'antigène pourront se transformer en cellules sécrétrices d'anticorps, les plasmocytes, et produiront alors des immunoglobulines d'isotypes particuliers (IgG_{2a}, IgG₃).

Une fois activés, les LTc sont alors en mesure de reconnaître les cellules cibles infectées ou devenues anormales. Les granules du LTc se polarisent et libèrent leur contenu en perforine et granzyme (protéase et estérase) à l'interface formée avec la cellule cible. Cette dégranulation va aboutir à la mort de la cellule cible. En effet, la perforine forme tout d'abord des canaux dans la membrane de la cellule à détruire ; les granzymes pénètrent ensuite par ces canaux pour provoquer la mort cellulaire [1]. Les LTc activés peuvent aussi exprimer le ligand de Fas, qui enclenchera l'apoptose des cellules devenues dangereuses pour l'organisme exprimant Fas à leur surface. Les cellules Natural Killer (NK) dérivent de la lignée des LT, mais ne possèdent

pas de récepteur spécifique d'antigène. Ces cellules sont spécialisées dans l'élimination des cellules anormales (cellules cancéreuses ou infectées par un antigène) par effet cytotoxique, s'il y a absence ou altération des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules cibles. De plus, elles peuvent également lyser des cellules recouvertes d'anticorps et sont également capables de tuer directement des bactéries. Leur rôle est complémentaire de celui des L_{Tc}.

Si le pathogène est extracellulaire (parasite extracellulaire ou toxine bactérienne par exemple), les L_{Th} vont alors se différencier en lymphocytes Th₂ sécrétant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 qui stimuleront notamment les LB qui se transformeront en cellules sécrétrices d'anticorps d'isotypes particuliers (IgG₁, IgA, IgE) spécifiques de l'antigène, c'est la réponse à médiation humorale [2]. Les L_{Th} peuvent également se différencier en d'autres types cellulaires comme celui des lymphocytes Th₁₇ qui stimulent une réponse pro-inflammatoire ou en lymphocytes T régulateurs qui induisent une tolérance aux auto-antigènes. Ces derniers interviennent également dans la régulation de la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGFβ.

Quel que soit le type de réponse, cellulaire ou humorale, des cellules mémoires T et B seront produites à l'issue de l'activation et persisteront longtemps dans l'organisme pour assurer une seconde réponse plus rapide lors d'un contact ultérieur avec le même pathogène.

III.3. L'activation des lymphocytes B

De la même façon, les lymphocytes B (LB) rencontrent leur antigène dans les organes lymphoïdes secondaires, principalement la rate et les ganglions lymphatiques et leur activation nécessite des signaux de co-stimulation. Ces signaux sont délivrés soit directement par des constituants microbiens, c'est le cas des antigènes T-indépendants ; soit par des L_{Th}, c'est le cas des antigènes T-dépendants (**Figure 7**).

Les antigènes T-indépendants de nature polysaccharidique ou lipopolysaccharidique sont divisés en deux groupes, les types I et les types II, qui permettent l'activation des LB selon deux mécanismes différents [1]. Les antigènes T-indépendants de type I possèdent une activité intrinsèque qui permet la prolifération et la différenciation polyclonale de lymphocytes B, c'est le cas par exemple du lipopolysaccharide bactérien (LPS) (**Figure 7A**). Il fait partie des PAMPs et interagit avec deux récepteurs présents à la surface des LB : le BCR et le Toll-Like Receptor 4 (TLR-4) [1]. L'activation de la voie du TLR-4 chez les LB va engendrer une cascade de signalisation qui est impliquée dans la réponse immunitaire innée [6]. Elle nécessite l'interaction du LPS avec son récepteur mais aussi avec d'autres protéines telles que la LPS

Binding Protein (LBP), la MD-2 et le CD14, qui sont des molécules associées au domaine extracellulaire (**Figure 8**). Ces deux derniers composés sont indispensables pour la transduction du signal [7]. Du côté cytoplasmique, l'activation du domaine TIR (Toll-Interleukin-1 Receptor) de la protéine adaptatrice MyD88 va déclencher une cascade de signalisation qui peut suivre deux voies : la voie MyD88-dépendante et la voie MyD88-indépendante. La première conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires alors que la seconde entraîne la synthèse d'IFN de type I [1, 8]. Ce type de réponse présente l'avantage de produire rapidement des anticorps spécifiques de l'antigène, mais sans commutation de classe, ni maturation de

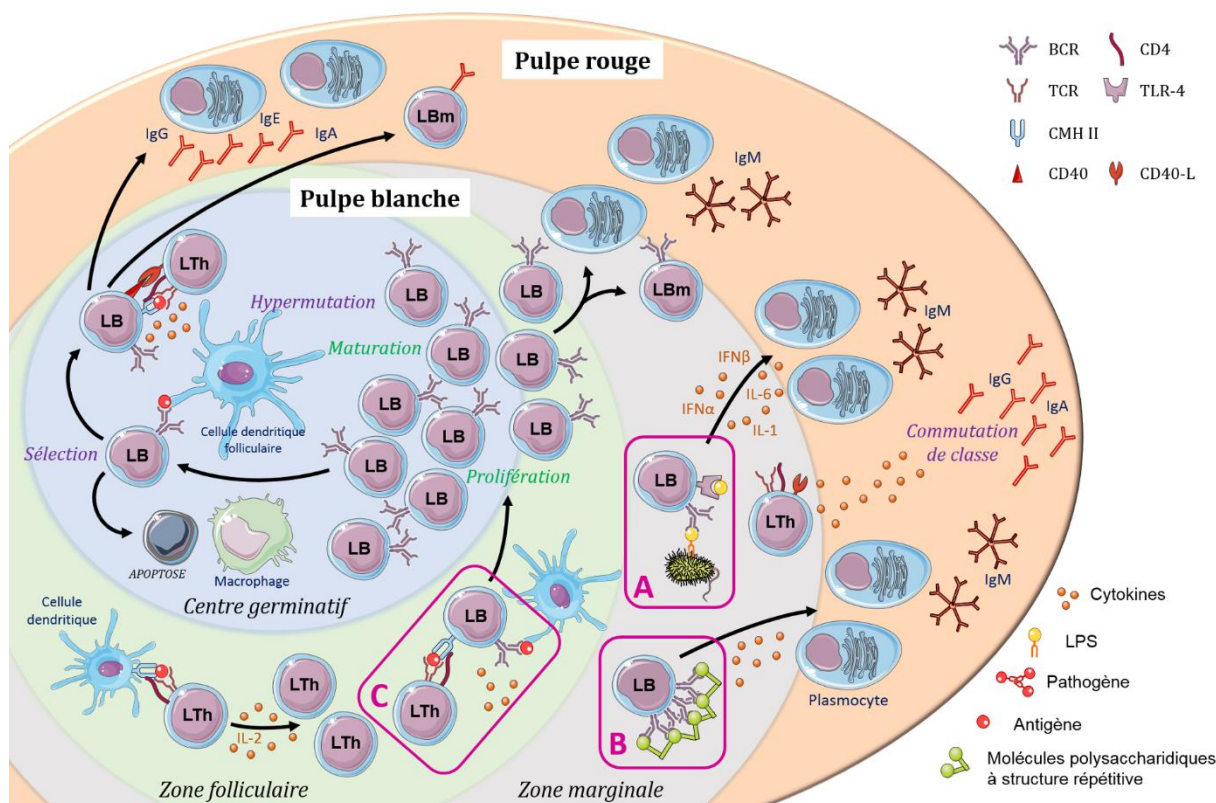


Figure 7 : Activation des Lymphocytes B par les antigènes T-indépendants et T-dépendants dans la rate. Les lymphocytes B (LB) sont activés par des signaux délivrés soit directement par des constituants microbiens, c'est le cas des antigènes T-indépendants ; soit par l'intermédiaire des LT auxiliaires (LTh), c'est le cas des antigènes T-dépendants. (A) Les antigènes T-indépendants de type I possèdent une activité intrinsèque stimulant les Toll-Like Receptor (TLR) et le récepteur des cellules B (BCR) qui va activer le LB. Celui-ci va se différencier en plasmocytes sécrétant d'IgM. (B) Les antigènes T-indépendants de type II, molécules polysaccharidiques à structures répétitives, sont reconnus par une population de LB matures qui vont ensuite se différencier en plasmocytes sécrétant d'IgM. La sécrétion de cytokines par les LTh peut induire une commutation de classe des IgM vers des IgG et IgA. (C) Les antigènes T-dépendants présentés par des cellules dendritiques aux LB se fixent sur le BCR. Les LTh ayant reconnu ce même antigène présenté à la surface de cellules dendritiques par le biais d'une molécule du CMH de classe II (CMH II), vont proliférer, se différencier et sécréter des cytokines qui vont activer les LB. Certains vont alors proliférer et se différencier en plasmocytes sécrétant d'anticorps d'isotype M ou en cellules B mémoires (LBm). D'autres vont proliférer dans les centres germinatifs et subir une sélection antigène-dépendante. Les LB ayant une meilleure affinité pour les antigènes présentés par les cellules dendritiques folliculaires sont retenus, tandis que les autres meurent par apoptose. Les LB sélectionnés vont recevoir un second signal par le biais du ligand de CD40 (CD40-L) à la surface des LTh, induisant ainsi la commutation de classe, les hypermutations somatiques et la différenciation en plasmocytes ou en LBm. Schéma réalisé avec les images de Servier Medical Art.

l'affinité, ni production de cellules mémoires. En effet, ces mécanismes nécessitent l'aide des LT auxiliaires qui expriment des molécules de co-stimulation, telles que le CD40 Ligand (CD40-L), indispensables à la maturation de la réponse humorale.

Les antigènes T-indépendants de type II sont des molécules polysaccharidiques de la paroi bactérienne à structures répétitives. Ils sont reconnus par une population de lymphocytes B matures apparaissant très tôt dans l'organisme et s'accumulant avec l'âge, notamment dans la zone marginale de la pulpe blanche de la rate (**Figure 7B**). La réponse à ce type d'antigène est rapide et spécifique vis-à-vis de nombreuses bactéries extracellulaires ayant une paroi riche en polysaccharides les protégeant de la phagocytose.

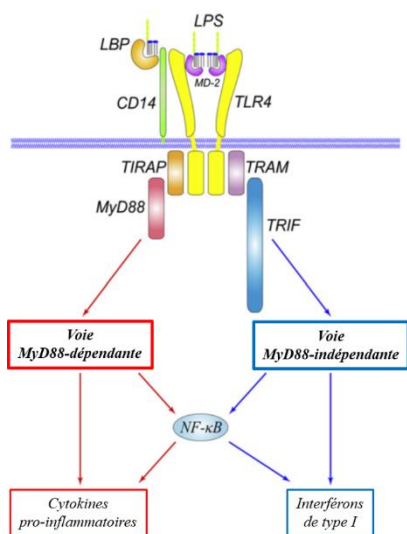


Figure 8 : TLR-4 et transduction du signal. Le récepteur spécifique du LPS sur les lymphocytes B est le récepteur Toll-Like 4 (TLR-4). Celui-ci va fixer le LPS avec la présence de la molécule MD-2 et ensuite activer la voie de signalisation permettant la stimulation et la prolifération des LB en suivant une des deux voies d'activation MyD88-dépendante ou MyD88-indépendante. (D'après Lu *et al.* [9])

Enfin, pour les antigènes T-dépendants, lorsqu'ils se fixent sur leur récepteur, un BCR présent à la surface des LB, et en présence de cytokines sécrétées par les LTh, ils entraînent, dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires, la différenciation des LB en plasmocytes qui vont alors sécréter cette immunoglobuline (**Figure 7C**). Le BCR des LB naïfs est une immunoglobuline d'isotype M, c'est donc cet isotype qui sera sécrété en premier lieu par les plasmocytes issus de l'activation du LB. Par la suite, des mécanismes génétiques s'opérant au sein de certains LB activés permettront un changement d'isotype (G, A ou E) appelé commutation de classe. L'isotype sera dépendant de la nature des cytokines sécrétées par les LTh. De plus, des hypermutations somatiques au niveau des gènes codant les parties variables des immunoglobulines augmenteront l'affinité de l'anticorps pour l'antigène. Cette maturation permet de produire des plasmocytes, sécrétant des anticorps dont l'efficacité dans l'élimination de l'antigène sera meilleure, et également des LB mémoires, qui persisteront dans l'organisme même après la disparition de l'antigène. Ces derniers pourront agir plus rapidement et plus efficacement lors d'un second contact avec ce même antigène [2].

Le stress et le système immunitaire

I. Le concept de stress en biologie

I.1. La définition du stress

Le stress, terme anglais venant de l'ancien français *destresse*, correspond à l'ensemble des réponses d'un organisme lorsqu'il est soumis à des pressions ou des contraintes venant de son environnement. Ce terme dérive de la notion en physique de la contrainte (stress) exercée sur un matériau qui provoque une déformation de celui-ci. Si la contrainte est excessive, le matériau va se déformer de manière irréversible. Ces notions décrivent donc le stress comme une adaptation contrainte où un excès de contrainte sera délétère.

En biologie, ce terme renvoie au concept de constance du milieu intérieur, défini par Claude Bernard au XIX^{ème} siècle, pour lequel on retrouve la notion d'un équilibre physiologique interne dynamique maintenu par des mécanismes capables de le réguler. Il a pour objectif de maintenir des conditions internes constantes face à des conditions externes variables [10]. C'est ensuite que les notions d'homéostasie et d'adaptation sont développées par Walter Cannon, physiologiste américain, au début du XX^{ème} siècle. L'homéostasie correspondant à un état stable maintenu par un processus actif de régulation [11]. Il a ainsi développé le concept de régulation homéostatique ce qui conduit à l'analogie de ce concept avec le terme de stress. L'homéostasie n'est maintenue que si les perturbations sont relativement faibles. Cela amène à la notion de "seuil critique" au-delà duquel apparaissent des "effets secondaires inadaptés" qui vont nécessiter l'intervention d'autres mécanismes correctifs. Lorsque ces mécanismes ne sont plus suffisants, comme par exemple lors d'un stress trop intense, prolongé ou répété, il en résulte une incapacité à maintenir l'homéostasie [11]. Cannon a également découvert la noradrénaline, un des facteurs de la réponse physiologique au stress, sécrétée après activation du système nerveux autonome qui déclenche un ensemble de modifications comportementales et végétatives. De plus, il a étendu ce concept d'homéostasie des paramètres physico-chimiques aux paramètres émotionnels [11].

Le terme "stress" a été généralisé en 1936 par le physiologiste canadien Hans Selye. Il en a donné la définition suivante : « le stress est une contrainte non-spécifique sur le corps provoquée par des irrégularités dans son fonctionnement normal ». Il a mis en évidence une réponse physiologique unique et stéréotypée au stress qui permet l'adaptation d'un individu à l'ensemble des situations stressantes dans le but de maintenir l'homéostasie. Celle-ci est déclenchée par toutes les contraintes exercées sur le corps, y compris les facteurs

psychosociaux. Il a également ajouté un troisième niveau de régulation homéostatique : la sécrétion hormonale médiée par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA). Chez l'homme et l'animal, il a défini ces réactions à court et long-terme de l'organisme en réponse au stress comme le "Syndrome Général d'Adaptation" correspondant à l'ensemble des moyens physiologiques et psychologiques mis en œuvre par un individu pour s'adapter à un événement donné [12]. Toutes ces manifestations hormonales et neurologiques sont, selon Selye, des indications objectives de la réponse de l'organisme au stress, état dans lequel ce syndrome est évoqué. Il va distinguer deux notions pour différencier les effets du stress. La première notion est l'*eustress*, qui est un stress positif et favorable accompagné d'émotions positives comme le bien-être, l'excitation ou la satisfaction, avec un sentiment de contrôle de la situation. La seconde notion est le *distress*, qui est un stress négatif et défavorable pouvant se traduire par un sentiment de frustration voire de détresse.

La définition du stress va s'élargir au cours de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle. Elle va désormais ajouter une dimension sociale au modèle physiologique et biologique initial pour devenir un modèle biopsychosocial. Le stress est alors montré comme étant un processus multifactoriel impliquant des relations entre des composantes affectives, sensorielles, endocriniennes, comportementales et sociales. Il est ainsi redéfini en 1985 par Lazarus *et al.* 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 » [13]. Le stress est, selon eux, défini comme une « transaction entre la personne et l'environnement » pour laquelle l'individu fait une évaluation de la situation stressante et des ressources dont il dispose pour y faire face. Cette focalisation sur les perceptions se traduit alors par une altération du bien-être qui peut amener à des stratégies d'ajustement émotionnelles et comportementales. Aujourd'hui, le stress, mécanisme de réponse, est donc un phénomène à la fois biologique, psychologique et social.

I.2. Les différentes étapes de la réponse au stress

Si les facteurs de stress sont nombreux et différents pour chaque individu, les mécanismes de réponse neuroendocriniens qui provoquent la sécrétion d'hormones et leurs conséquences sur l'organisme sont identiques. Le corps induit une réponse physiologique bien spécifique consécutive à un agent stressant perçu par les récepteurs sensoriels. Selon le syndrome général d'adaptation défini par Selye, la réponse adaptative de l'organisme est un processus actif qui va se dérouler en trois étapes : (i) la phase d'alarme durant laquelle les forces de défenses sont mobilisées, (ii) la phase de résistance qui correspond à la phase d'adaptation à l'agent stressant

et (iii) la phase d'épuisement lorsque les capacités d'adaptation sont épuisées suite à une présence prolongée de l'agent stressant. La phase initiale de réaction au stress provoque des réactions émotionnelles avant de mettre en jeu des réactions hormonales. La première étape est en réalité une interprétation subjective du stimulus stressant.

La première réaction, ou phase d'alarme, est caractérisée par les réponses immédiates, locales et neurovégétatives. Elle est de courte durée, survient en quelques secondes et favorise la mobilisation des stocks énergétiques d'utilisation rapide. La réaction physiologique correspond à la libération dans le système sanguin de catécholamines, adrénaline et noradrénaline, par les glandes surrénales. Cette première réponse est responsable de l'augmentation de la pression artérielle, du rythme cardiaque et de la concentration plasmatique en acides gras libres et en glucose [14, 15]. La noradrénaline va également stimuler le système nerveux central (SNC) et induire une augmentation de la vigilance et du fonctionnement cérébral, ce qui va permettre à l'individu de s'adapter vis-à-vis de la situation stressante [16].

La seconde réaction, ou phase de résistance, va se mettre en place si le stress perdure. Elle se développe en quelques minutes et correspond à l'activation de l'hypothalamus par les centres supérieurs et conduit à la sécrétion de cortico-releasing hormone (CRH) ou corticolibérine [17]. L'hypophyse répond à la libération de CRH par la sécrétion d'adrénocorticotrophine (ACTH) dans le sang, ce qui aboutit à la libération, par les glandes surrénales, de minéralocorticoïdes et de glucocorticoïdes (**Figure 9**). Les minéralocorticoïdes, comme l'aldostérone, interviennent dans l'homéostasie ionique. Tandis que les glucocorticoïdes, comme le cortisol chez l'Homme ou la corticostérone chez les rongeurs, ont pour fonction de relayer et d'amplifier l'action des catécholamines, au niveau énergétique, en favorisant la production de glucides. Ces hormones lipophiles vont passer facilement la barrière hémato-encéphalique et agir au niveau du SNC pour réguler l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) en contrôlant l'activité sécrétrice de la CRH par l'hypothalamus permettant ainsi un rétrocontrôle. La corticostérone va se fixer sur les récepteurs aux glucocorticoïdes seulement lorsqu'ils sont présents en forte concentration, c'est-à-dire lors du pic journalier et lors d'un stress [18]. En effet, les glucocorticoïdes ne sont pas sécrétés uniquement en situation de stress. Ils le sont aussi pour maintenir un fonctionnement normal de l'organisme. Leur sécrétion basale va permettre de réguler le rythme circadien veille/sommeil. Lors d'un stress les corticoïdes agissent en se fixant sur leurs récepteurs au niveau du cerveau pour favoriser la mémorisation de l'événement stressant. Ils permettent également de mobiliser l'énergie de l'organisme en inhibant les fonctions physiologiques non indispensables à la survie immédiate comme la fonction reproductrice ou encore le système immunitaire. D'autres hormones et neurotransmetteurs

interviennent lors de cette réponse, comme notamment l'hormone neurotrophique, l'hormone de croissance, la prolactine, les enképhalines et le neuropeptide Y qui sont également des molécules sécrétées par l'hypophyse et l'hypothalamus. Leur production est altérée ou augmentée selon le type de stress subi par l'organisme [19–21]. La durée de cette phase va dépendre de l'intensité du stress et des capacités d'adaptation de l'organisme. Lorsque suffisamment d'hormones de stress ont été sécrétées et qu'elles ont rempli leurs fonctions, un rétrocontrôle négatif va se mettre en place pour stopper le mécanisme de réponse.

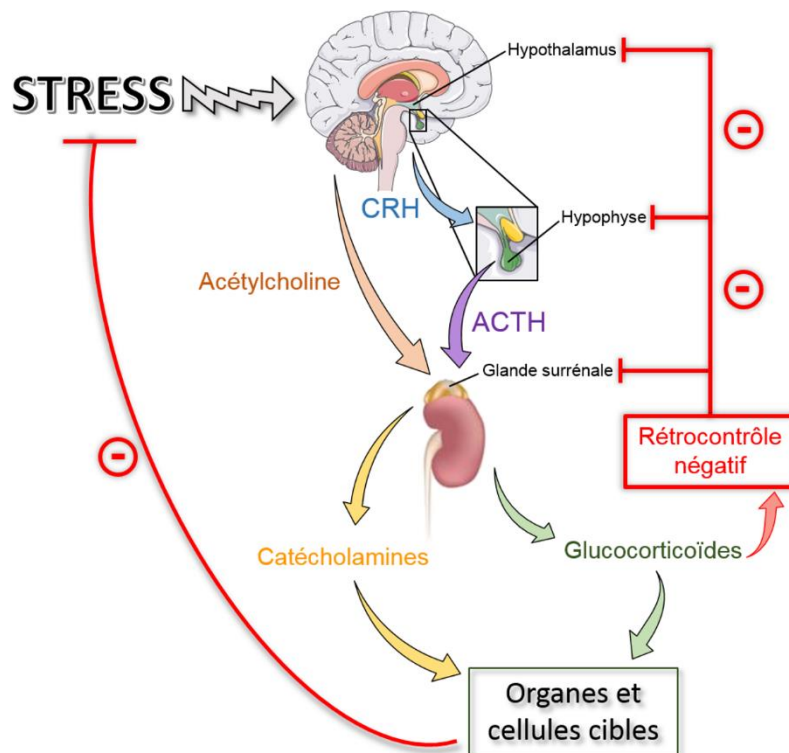


Figure 9 : Schéma de la réponse au stress par le SNS et l'axe HPA. Lorsqu'un stress est perçu par le cerveau, la réaction d'alerte entraîne en quelques secondes la libération de catécholamines par les glandes surrénales. Puis l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) s'active lors de la phase de résistance et l'hypothalamus va répondre au stress en sécrétant l'hormone corticolibérine ou cortico-releasing hormone (CRH). Celle-ci va ensuite se fixer sur ses récepteurs au niveau de l'hypophyse qui va alors libérer l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) qui va à son tour activer la sécrétion de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. Ceux-ci vont agir sur les organes et cellules cibles tout en relayant et amplifiant l'action des catécholamines. Les glucocorticoïdes vont également agir sur le système nerveux central et les glandes surrénales pour modérer l'activation de l'axe HPA par rétrocontrôle négatif. Les taux d'hormones et de neurotransmetteurs reviendront à leur niveau basal si le stress ne perdure pas. (D'après Glaser et Kiecolt-Glaser [22])

La troisième réaction, ou phase d'épuisement, va intervenir lorsque le stimulus stressant se répète trop souvent ou dure trop longtemps. L'organisme ne peut alors plus s'adapter, il va alors subir des conséquences délétères. En effet, la réponse prolongée au stress va entraîner une diminution des défenses immunitaires et une consommation des ressources énergétiques lipidiques et protéiques, mais également une dérégulation physiologique globale, pouvant expliquer l'épuisement de l'organisme. Cet épuisement peut se manifester de plusieurs

manières : des ulcérations gastro-intestinales, une augmentation de la taille du cortex surrénalien, une absence de prise de poids [23], un niveau plasmatique élevé de glucocorticoïdes due à l'altération de leur rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA [24], ou encore une réduction de la taille des organes lymphoïdes [25]. Des modifications comportementales peuvent également être observées telles que l'anxiété ou encore la dépression si le stress est trop aigu ou s'il perdure. L'anxiété est une émotion induite par le stress et un sentiment de peur sans objet. La dépression, quant à elle, est une perturbation du dynamisme de la vie psychique, qui se caractérise par une diminution plus ou moins importante de l'énergie mentale, marquée entre autres par le découragement ou encore une anhédonie, incapacité pour l'individu de ressentir une quelconque émotion. La dépression est toujours associée à un taux plasmatique élevé de glucocorticoïdes. L'hippocampe alors saturé de glucocorticoïdes ne peut plus assurer la régulation de leurs récepteurs. Les glucocorticoïdes vont alors envahir le cerveau (hippocampe, amygdale, cortex cingulaire antérieur et cortex préfrontal principalement). Cette baisse de la régulation est associée à une altération du rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA [24].

I.3. Les différents types de stress

Il existe de nombreux facteurs environnementaux susceptibles de perturber l'équilibre de l'organisme et donc de produire une réponse neuroendocrinienne. Cette réponse dépendra de l'origine de ce facteur, de son intensité, de sa durée et de l'individu lui-même. En effet, face à un même stress, la réponse peut varier selon les individus, elle dépendra du génotype, de l'âge, du sexe, du statut social, *etc.* [26].

On distingue le stress homotypique, correspondant à un facteur de stress répété toujours de même nature, du stress hétérotypique qui est une combinaison de différents facteurs. Lors de la première rencontre d'un stress homotypique, la réponse de l'axe HPA est maximale puis elle va rapidement et durablement diminuer. Cette désensibilisation, souvent assimilée à une habituation de l'individu à la situation de stress, va se caractériser par une diminution de la libération d'ACTH dans le sang et un retour plus rapide des glucocorticoïdes à leur niveau plasmatique basal. En revanche, le contact avec un stress hétérotypique va renforcer l'intensité de la réponse qui peut perdurer. Ainsi, lorsque des rats sont soumis à un protocole de stress variés et imprévisibles, l'habituation ne s'établit pas [27].

Le stress aigu, ou stress occasionnel, provoque une réponse intense correspondant à la phase d'alarme précédemment décrite. Ce type de stress découle d'événements ou de situations spécifiques pour lesquelles l'individu va ressentir une perte de contrôle et qui impliquent des éléments d'imprévisibilité et de nouveauté. Le stress aigu n'est pas nécessairement délétère,

puisque'il stimule la sécrétion d'hormones qui aident à gérer la situation et à rétablir l'homéostasie de l'organisme.

Le stress chronique, venant de l'exposition prolongée et/ou répétée à un ou plusieurs facteurs stressants, est récurrent, plutôt de faible intensité et dont les conséquences sur l'organisme sont de plus grande ampleur et de plus longue durée que celles observées lors d'un stress aigu. Il peut aboutir au stade d'épuisement si l'organisme ne parvient pas à se rééquilibrer. Ses conséquences font donc l'objet de nombreuses études autant chez l'humain que chez les animaux d'élevage ou de laboratoire. Les stress chroniques affectent notamment le système immunitaire, ce qui peut mener au développement de pathologies graves, notamment des pathologies infectieuses ou tumorales.

II. Les effets du stress sur le système immunitaire

Les hormones, catécholamines et glucocorticoïdes, libérées au cours de la réponse au stress sont susceptibles d'agir sur le système immunitaire. En effet, de nombreuses cellules du système immunitaire inné (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques) et adaptatif (LT, LB, cellules NK) possèdent à leur surface des récepteurs spécifiques de ces molécules. De plus, les organes lymphoïdes primaires (thymus, moelle osseuse) et secondaires (rate et ganglions) sont sous le contrôle de terminaisons nerveuses sympathiques et cholinergiques [28]. Enfin, plusieurs cytokines immunorégulatrices, comme l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IFN γ et le TNF α sont produites non seulement par le système immunitaire, mais aussi par le système neuroendocrinien. Ainsi la communication entre ces deux systèmes est bidirectionnelle et suggère un rôle immunorégulateur pour le cerveau et une fonction sensorielle pour le système immunitaire. Les associations entre le stress et les conséquences pour la santé ont été soigneusement documentées, mais les mécanismes par lesquels le stress influe spécifiquement sont encore mal compris [29]. Les difficultés sont dues à l'extrême variabilité des procédures de stress et aux modèles animaux utilisés dans ces études. D'une façon générale, il a été souvent démontré qu'un stress aigu est plutôt stimulateur de l'immunité innée et qu'un stress chronique est plutôt inhibiteur de l'immunité adaptative [30–32].

II.1. Les effets du stress sur l'immunité innée

Le stress peut favoriser ou inhiber certaines fonctions antimicrobiennes des macrophages et des neutrophiles. En effet, l'activité phagocytaire des macrophages spléniques peut être stimulée par un stress social [33] alors que des stress physiques inhibent l'activité phagocytaire

et la production d'oxyde nitrique [34, 35]. Par exemple, la fonction des phagocytes est altérée chez l'Homme, après un court stress psychosocial, ce qui se traduit par une diminution de la production des espèces réactives de l'oxygène par ces cellules [36]. La production de glucocorticoïdes est également responsable de l'altération de la migration des phagocytes, macrophages et neutrophiles, vers le site inflammatoire en inhibant l'expression de la chimiokine MCP-1 chez la souris après 24 h de stress de contention [37]. Les glucocorticoïdes produits en réponse au stress chronique ont également un effet négatif sur la différenciation et la prolifération des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes et réduisent l'expression des molécules d'adhésion impliquées dans le trafic cellulaire [38].

Par ailleurs, le stress réduit la présentation de l'antigène aux lymphocytes T, en diminuant l'expression des molécules du CMH de classe II par les macrophages et par les cellules dendritiques [39, 40]. En particulier, la capacité de l'IFN γ à induire l'expression des molécules du CMH de classe II par les macrophages péritonéaux est diminuée chez les animaux ayant subi un stress aigu [41, 42]. Les glucocorticoïdes inhibent aussi l'expression des molécules de co-stimulation par les cellules dendritiques [43].

La réponse pro-inflammatoire est également affectée après un stress aigu comme après un stress chronique. En effet, une étude, menée chez des jeunes veaux montre que le stress par sevrage précoce entraîne une augmentation du cortisol sérique associée à une augmentation de TNF α et une diminution d'IFN γ dans les premiers jours de stress [44]. La production d'IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α et MIP-1 β est également altérée après stimulation *in vitro* de neutrophiles et monocytes chez des sportifs de haut niveau [45].

Par ailleurs, le nombre et l'activité des cellules NK sont également modifiés en réponse à un stress. En effet, chez le macaque cynomolgus, un stress aigu va entraîner une augmentation du nombre de cellules NK circulantes et une diminution de leur capacité d'adhésion et de leur activité cytotoxique [46]. Le stress aigu peut ainsi contribuer à la prolifération de cellules cancéreuses. Des souris infectées par le virus de l'herpès présentent une diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK associée à une augmentation de l'infection virale après un stress de contention [47]. Ces bouleversements des fonctions des cellules NK se retrouvent également chez l'Homme lors de stress psychosociaux [48, 49]. L'altération de l'activité des cellules NK est aussi retrouvée dans le cas de la dépression nerveuse, conséquence de stress chronique prolongé [50].

II.2. Les effets du stress sur l'immunité adaptative

Le stress a longtemps été considéré comme immunosuppresseur parce qu'il agit négativement sur les lymphocytes. D'ailleurs, les glucocorticoïdes sont responsables de l'apoptose des thymocytes qui conduit à une involution thymique et une diminution importante du répertoire des LT [51]. Le nombre de LT totaux circulants est diminué lors de stress psychosociaux chez l'Homme comme chez la plupart des mammifères [52, 53]. De nombreuses études ont également montré que le stress chronique diminuait la prolifération des lymphocytes *in vivo* et *in vitro* [54, 55] et la production de certaines cytokines [56, 57]. Cependant, l'effet sur la réponse aux mitogènes dépend de nombreux facteurs, non seulement de la nature du stress mais aussi de la population de lymphocytes étudiés. La prolifération des LT après stimulation *in vitro* est altérée alors que celle des LB est augmentée après que l'animal ait subi un stress social prolongé [53]. Les mêmes effets sont observés chez l'Homme avec, par exemple, une altération de la prolifération des LT stimulés *in vitro* par des antigènes viraux chez des étudiants en période d'examens [58].

La migration des lymphocytes est également modifiée après un stress chronique, comme par exemple après un stress psychosocial chez le rat, qui perturbe leur déplacement vers les sites infectieux [53]. De plus, ce même type de stress chez l'Homme est lié à une diminution de l'IL-2 circulante, ou de son récepteur exprimé sur les lymphocytes T, et de l'IFN γ [59]. Une diminution de l'expression des cytokines de type Th1 est également observée en conditions de stress chronique [60]. De façon générale mais non systématique, les glucocorticoïdes vont induire une inhibition de la production des cytokines de type Th1 qui est concomitante à une activation de l'expression des cytokines de type Th2 [29, 31]. Cet effet sur la balance Th1/Th2 reporté de nombreuses fois permettrait d'expliquer plusieurs pathologies associées au stress [31]. En orientant le système immunitaire vers une réponse de type humoral, le stress aurait un effet immunosuppresseur lorsque l'organisme doit faire face à une infection virale ou bactérienne qui nécessite le plus souvent une réponse Th1, mais pourrait en même temps favoriser une exacerbation des réponses allergiques ou des maladies auto-immunes, caractérisées par un profil Th2.

La production d'anticorps par les LB activés est également affectée, même en absence d'infection, lors d'un stress. Chez la souris infectée par un virus, le taux plasmatique d'IgM est altéré suite à un stress physique [61]. De même, 12 h de contention induisent une diminution de la production d'IgG et d'IgE chez la souris après une immunisation [62]. En revanche, la production d'IgG est augmentée suite à un stress physique aigu chez la souris, tandis qu'elle se trouve altérée si celui-ci perdure de façon chronique [63]. L'inhibition des fonctions des

lymphocytes B par le stress n'est pas systématique. Il peut parfois augmenter la production d'anticorps [64, 65] et la prolifération des lymphocytes [65, 66]. Il est surtout notable que le taux d'IgA sériques est fortement augmenté, lors d'un stress psychosocial chez l'Homme, alors que les concentrations en IgG et IgM ne sont pas modifiées [67]. Selon plusieurs études, le développement de la réponse spécifique peut être altéré par le stress mais durant une période bien définie. En effet, lors d'une réponse humorale primaire, l'exposition au stress serait critique juste avant ou pendant les 24 heures suivant la vaccination alors qu'elle n'aurait que peu ou pas d'effet en survenant plus tardivement [65, 68–70].

II.3. Les effets bénéfiques du stress sur le système immunitaire

Les recherches menées en psychoneuroimmunologie ont montré que les dérégulations immunitaires induites par le stress peuvent avoir des conséquences significatives sur la santé. La réponse aux vaccins est diminuée, la cicatrisation d'une plaie est ralentie, probablement *via* une diminution de la réponse inflammatoire, des virus latents sont réactivés et le risque de développer des maladies infectieuses plus sévères est augmenté. Les stress chroniques pourraient même être impliqués dans l'initiation, la progression et le développement de cancers [22, 71].

Toutes ces études ont largement mis en évidence un impact négatif des stress sur le système immunitaire de l'Homme ou des animaux. Cependant la prolactine, l'hormone de croissance ou encore l'hormone neurotrophique sont capables d'agir sur les cellules du système immunitaire, à l'inverse des catécholamines et des glucocorticoïdes, ces hormones auraient un effet immunostimulateur [72, 73]. L'hormone de croissance favoriserait la prolifération des cellules lymphoïdes. En agissant comme une cytokine, elle stimulerait ainsi la production d'anticorps, l'activité des cellules NK et maintiendrait l'activité des macrophages [74]. La prolactine stimulerait l'expression du récepteur à l'IL-2, la prolifération des lymphocytes et l'activité des cellules NK [75–77]. Enfin, l'hormone neurotrophique favorise la prolifération des lymphocytes et la différenciation des LB en plasmocytes [78]. Cependant, les effets bénéfiques de ces hormones sur le système immunitaire ne sont généralement pas assez puissants pour contrer efficacement les effets immunosuppresseurs des glucocorticoïdes produits massivement lors d'une réponse au stress chronique.

Les missions spatiales

La présence humaine en orbite basse de la Terre et au-delà est actuellement en expansion. Aujourd'hui la possibilité de voyager dans l'espace pour de longues périodes est de plus en plus d'actualité ; comme à bord de la Station Spatiale Internationale ou avec les missions prévues vers Mars. Lors des vols spatiaux, les membres d'équipage sont exposés à de nombreux changements environnementaux. Ainsi, l'élargissement de nos connaissances sur les effets d'un vol spatial de longue durée sur la santé et la performance de l'équipage est indispensable.

I. Les modifications environnementales

I.1. Les contraintes physiques et psychologiques

Durant les vols, les astronautes doivent s'adapter à cet environnement particulier et extrême qu'est l'espace. Les vols habités sont un modèle unique de stress multifactoriels, ou hétérotypique, comprenant de nombreuses contraintes physiques, mais également des contraintes psychologiques et environnementales [79].

Les astronautes sont entraînés afin de contrer les bouleversements physiologiques et psychologiques qu'ils vont rencontrer lors d'un vol habité. Ils vont notamment devoir s'adapter à un isolement social, car les équipes sont composées d'un petit nombre d'astronautes de différentes nationalités, et à l'éloignement de leurs proches. En vol, il y a également une rupture du rythme circadien, qui est une organisation séquentielle des diverses fonctions de l'organisme au cours d'une période de 24 h. Ils vont devoir changer leurs habitudes alimentaires et s'acclimater au bruit présent dans les habitacles. Ils doivent aussi se préparer au danger et aux décisions rapides qu'ils peuvent être amenés à prendre [80]. Il y a également toujours la peur permanente d'une avarie fatale pour l'ensemble de l'équipage. Les contraintes physiques, quant à elles, sont de différentes natures et sont présentes constamment lors d'une mission spatiale. Les astronautes sont notamment confrontés à un confinement avec peu de liberté de mouvement, que ce soit lors du vol ou en orbite basse. Leur organisme doit également faire face à des radiations cosmiques, qui sont des particules chargées de haute énergie, et des rayonnements ultra-violets et gamma. La température est aussi un facteur de stress physique, car elle augmente brutalement et de manière transitoire dans les habitacles Soyuz lors du décollage et de l'entrée dans l'atmosphère avant l'atterrissage. A cela s'ajoute une augmentation du dioxyde de carbone dans ces habitacles suite au renouvellement de l'air. Enfin, la plus grande perturbation que l'organisme rencontre lors d'un vol spatial est la modification

de la gravité. Deux types de modification de la gravité surviennent lors d'un vol spatial, l'hypergravité et la micropesanteur. L'hypergravité est une augmentation de la gravité qui est ressentie de façon intense lors des phases d'accélération au moment du décollage et de l'atterrissage des navettes habitées. La micropesanteur est un état dans lequel les effets de la pesanteur sont presque annihilés. Lors d'un vol en orbite basse, ce qui est le cas des vols habités actuels, il subsiste toujours une faible pesanteur résiduelle. Le terme de micropesanteur, traduit par *microgravity* en anglais, est différent de la microgravité qui correspond à un état pour lequel l'ensemble des forces d'origine gravitationnelle sont très faibles. Ce qui est le cas dans l'espace profond, loin de tout corps attracteur, comme une galaxie par exemple.

I.2. Les conséquences sur l'organisme

L'ensemble de ces changements environnementaux, constituant des facteurs de stress, provoquent des altérations physiologiques lors des missions spatiales (**Figure 10**). La micropesanteur est l'effet le plus important sur la physiologie humaine, tous les organes sont affectés à un certain degré. Elle entraîne notamment une déminéralisation osseuse, une atrophie musculo-squelettique et une diminution des fonctions immunitaires [81]. La perte osseuse peut aussi être due au manque de lumière et de vitamine D. De plus, il y a une acclimatation du système cardio-vasculaire à la micropesanteur, mais à ce jour le mécanisme n'est pas encore élucidé. Cette acclimatation est nécessaire, car il y a une redistribution des fluides corporels vers la tête. Durant une mission spatiale, une diminution de 10% du volume des membres inférieurs a été mise en évidence, ainsi que l'apparition d'un visage bouffi. Ces deux phénomènes sont regroupés sous le nom de syndrome « puffy face - bird leg ». Cette répartition des fluides corporels entraîne également une augmentation de la vitesse de filtration glomérulaire rénale induisant une perte en eau. L'augmentation de l'hématocrite sera compensée par une diminution, voire un arrêt, de la production des globules rouges, provoquant une anémie au retour sur Terre. La micropesanteur influe aussi sur l'oreille interne et ses récepteurs qui ne sont plus soumis à la gravité. Les yeux deviennent alors les seuls organes de l'équilibre. De plus, des variations de températures, un asynchronisme circadien et le bruit peuvent contribuer à la fatigue et au manque de sommeil représentant des facteurs de stress chroniques importants [79]. Le confinement est également source d'anxiété et de tension entre les membres de l'équipage. Ces perturbations et l'acclimatation vont entraîner une modification de l'homéostasie de nombreux systèmes physiologiques comme les systèmes cardio-vasculaire, neurosensoriel, endocrinien, osseux et immunitaire. Ces mesures d'adaptation peuvent affecter la santé et la performance de l'équipage dans l'espace et à son retour sur Terre.

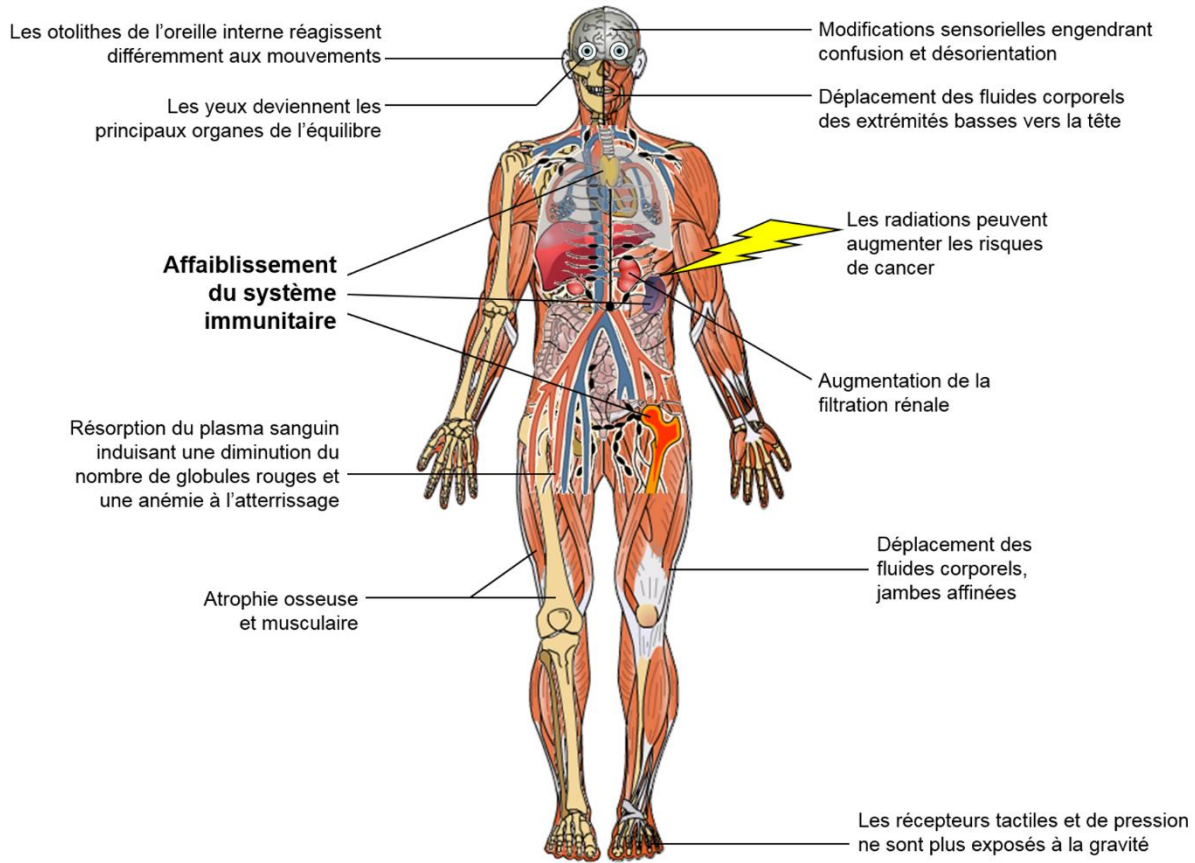


Figure 10 : Effets d'une mission spatiale sur l'organisme. Durant une mission spatiale, plusieurs contraintes physiques, sociales et environnementales sont combinées et influent sur de nombreuses fonctions physiologiques. Cette représentation schématique du corps humain permet d'avoir une vue générale de la façon dont les fonctions les plus importantes sont impactées par un vol spatial. (D'après Guéguinou *et al.* [81])

II. Les effets d'un séjour dans l'espace sur le système immunitaire

Des dérégulations du système immunitaire ont été observées chez les astronautes pour la première fois dans les années 60. Des infections bactériennes ou virales ont été remarquées chez les astronautes pendant le vol ou peu de temps après leur retour sur Terre [79]. 15 des 29 astronautes des missions Apollo ont contracté des infections bactériennes ou virales, soit au cours de la mission, soit dans la semaine de retour [81–83]. Ces vols ont provoqué également la réactivation de virus latents comme les virus de l'herpès et de la varicelle ou du cytomégalovirus [84–86]. Depuis, un grand nombre d'études a été mené pour comprendre comment cet environnement extrême affectait le système immunitaire, mais aussi les microorganismes [81, 87]. Elles ont montré que la croissance de nombreux microorganismes, dont *Escherichia coli*, était modifiée durant les vols spatiaux [88] ainsi que la physiologie, l'expression génique et la pathogénicité des microorganismes présents soit dans les stations spatiales soit dans l'organisme de l'hôte [89]. De plus, dans cet environnement les antibiotiques sont moins efficaces [90]. Il a également été prouvé que la virulence des microorganismes

pathogènes augmentait [91, 92] et qu'ils pouvaient se développer plus facilement [88, 93]. Ces conséquences, associées à l'affaiblissement général des défenses de l'organisme, représentent donc un danger pour la santé des astronautes et justifient les nombreuses études réalisées pour déterminer les mécanismes à l'origine de ces altérations au niveau du système immunitaire.

II.1. Les impacts sur l'immunité innée

Les cellules impliquées dans l'immunité innée sont affectées par les vols spatiaux, avec notamment une diminution du nombre de cellules souches myéloïdes des lignées granulocytaires et monocytaires de la moelle osseuse [94]. Le nombre de neutrophiles et de monocytes est augmenté dans le sang des astronautes après un vol spatial, alors que celui des cellules NK est diminué [95]. Ceci s'explique probablement par une modification de la distribution des leucocytes circulants et une altération de la production de cytokines de type Th1 [96–98]. La phagocytose des bactéries *Escherichia coli* par les monocytes est diminuée après un vol spatial [99]. Chez des souris ayant volé, la différenciation en macrophage est augmentée dans la moelle osseuse et les neutrophiles sont activés en réponse à l'atterrissage [100]. La micropesanteur agit également sur les monocytes qui perdent leur capacité à sécréter de l'IL-1 β [101]. La réactivation des virus latents évoquée précédemment est corrélée à une diminution de la production d'IFN γ [102]. Une réponse anti-inflammatoire avec une augmentation de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-10 par les splénocytes des souris de la mission STS-118 après stimulation au LPS a été observée, tandis que la production de TNF α était diminuée [103].

II.2. Les impacts sur l'immunité adaptative

Les séjours dans l'espace ont également un impact sur les organes lymphoïdes et les lymphocytes. Une hypoplasie de la rate, des ganglions lymphatiques et du thymus a été observée chez les rats après un vol de 22 jours [104]. Des souris ayant volé 13 jours ont des masses splénique et thymique plus faibles [103]. Néanmoins les résultats concernant le thymus sont controversés. Après un vol spatial, la masse thymique peut être diminuée, similaire ou augmentée par rapport aux souris contrôles sur Terre [103–106]

De nombreuses études ont également montré que ces missions induisent une déficience de l'immunité à médiation cellulaire. En effet, les vols provoquent une modification non seulement de la distribution des leucocytes, mais aussi des fonctions des LT cytotoxiques [107, 108]. Sous l'effet de la micropesanteur simulée par rotation, la motilité des lymphocytes est inhibée par le collagène de type 1 et la migration potentielle des cellules CD34⁺ de la moelle

osseuse diminue, alors que les LT sont plus mobiles sous hypergravité à 10G, probablement à cause de la modification de la formation des filaments d'actine [109]. Cette redistribution cellulaire s'explique aussi par la baisse de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et par la modification de la répartition des fluides corporels [110].

L'analyse d'échantillons sanguins provenant d'astronautes ayant séjourné plusieurs semaines dans l'espace a révélé une diminution significative de la réponse proliférative *in vitro* des lymphocytes T [111] et une inhibition de la blastogenèse lymphocytaire [112]. Des études *in vitro* menées en vol ou au retour des astronautes ont pu montrer que la micropesanteur altérait la voie MAPK des lymphocytes T et modifiait la cascade des voies de signalisation *via* la protéine kinase C, nécessaire à leur activation [113]. De plus, la réduction de la prolifération des lymphocytes T cultivés en micropesanteur ou prélevés chez les astronautes peut être provoquée par la diminution de l'expression du récepteur de l'IL-2 et de la production de cette cytokine par les LTh [109].

Concernant la production d'anticorps, aucune différence du taux plasmatique d'immunoglobulines après un vol de courte durée n'a été observée [114, 115]. En revanche, après un vol prolongé, les résultats sont plus hétérogènes avec soit une augmentation des taux sériques d'IgA et IgG, soit aucune modification des IgA, IgG et IgM [116, 117]. L'expérience Genesis, réalisée à bord de la station Mir, au cours de laquelle des pleurodèles adultes ont été immunisés en vol, a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression des chaînes lourdes des IgY, équivalents des IgA chez les mammifères [118]. Des changements d'expression des segments variables des chaînes lourdes d'IgM en réponse à la stimulation antigénique ont également été observés [119]. De plus, le nombre d'hypermutations somatiques des gènes codant les parties variables des anticorps a été diminué d'un facteur 2 chez les animaux immunisés en micropesanteur [120]. Or les domaines variables jouent un rôle important dans la reconnaissance des antigènes et l'efficacité des réponses humorales. L'expérience Amphibody, réalisée à bord de la Station Spatiale Internationale, a permis de montrer que l'expression des chaînes lourdes d'IgM est modifiée par un changement de la gravité [121]. L'environnement spatial affecte donc également la réponse immunitaire humorale. Cependant, le nombre d'études s'intéressant aux lymphocytes B et à leur activation est plus restreint que celui portant sur les lymphocytes T.

Le projet de recherche

I. Les modèles animaux

Si au cours de ces quatre dernières décennies de nombreuses études se sont focalisées sur les effets d'un vol spatial sur l'organisme, les scientifiques ont été confrontés à des difficultés pour récolter des informations. Le faible nombre de missions et les problèmes techniques posés par l'utilisation de modèles animaux dans l'espace sont les principaux obstacles. C'est pourquoi un grand nombre d'expériences ont utilisé des modèles animaux au sol. Ces modèles au sol se sont attachés à reproduire au mieux les modifications de l'environnement spatial afin de mettre en évidence les mécanismes à l'origine de leurs effets sur l'organisme.

Les conséquences des radiations, des perturbations du rythme circadien, du confinement, de la chaleur et du bruit ont été largement étudiés. Cependant, ce sont les modifications de la gravité qui ont fait l'objet des plus nombreuses expériences. Des modèles ont été mis au point afin de mimer les effets de la micropesanteur ou ceux de l'hypergravité. Chez les rongeurs, la suspension anti-orthostatique permet de reproduire certains des effets ressentis par les astronautes en micropesanteur lors d'un vol habité en orbite basse ; notamment des pertes de masses musculaire et osseuse aux niveaux des membres inférieurs et une augmentation du flux sanguin vers le haut du corps [122]. Le second modèle est la centrifugation qui reproduit les effets de l'hypergravité ressentie au décollage et à l'atterrissage [123]. Ces techniques sont validées par la NASA et les différents comités d'éthique d'expérimentation animale. Enfin, pour étudier les effets de stress chroniques psychoenvironnementaux qui sont vécus par les astronautes, plusieurs modèles sont utilisés. Le plus récent expose les rongeurs à différents types de changements d'environnement au quotidien. Le principe repose sur la chronicité et la variété de stress légers [124, 125].

Ces trois modèles seront utilisés dans ce travail de recherche afin de reproduire au plus près, chez des souris mâles, les modifications observées sur l'organisme des astronautes. Le choix de travailler uniquement avec des mâles permet d'éliminer toute interférence potentielle pouvant être due notamment à l'œstrus des femelles. La durée des expérimentations a été fixée à 21 jours, ce qui correspond à un vol long à l'échelle humaine (environ 500 jours). En effet, la présence humaine dans l'espace est de plus en plus longue. Il est donc important d'étudier ces effets sur une période prolongée.

II. Les objectifs du travail

Jusqu'à présent l'immunité humorale des astronautes a été très peu étudiée. Les résultats précédemment acquis par le laboratoire ont mis en évidence une augmentation des IgY [118], un changement d'expression des segments variables des chaînes lourdes d'IgM et une diminution du nombre d'hypermutations somatiques des anticorps d'amphibiens immunisés au cours d'un vol spatial [119, 120]. Récemment, l'équipe a montré que l'hypergravité a un impact sur les lymphocytes de la rate chez la souris [126]. C'est pourquoi ce travail a eu pour objectifs d'approfondir les effets des modifications de la gravité sur la réponse lymphocytaire *in vitro* chez des souris soumises à différentes conditions de stress gravitaires. Les résultats ont été comparés avec ceux de souris soumises à une combinaison de stress ultra légers. Ces recherches, réalisées en collaboration avec d'autres équipes, ont pour but, à terme, de trouver des moyens de renforcer le système immunitaire.

Tout d'abord, le modèle de suspension anti-orthostatique a été mis en place au laboratoire afin de réaliser plusieurs expérimentations. Ses conséquences ont été évaluées sur la composition lymphocytaire de la rate, l'état de stress des animaux et la réponse proliférative des lymphocytes B et T *in vitro*. La production de cytokines et des immunoglobulines M, G et A sécrétées a également été quantifiée. Ensuite, les effets de la suspension anti-orthostatique sur la lymphopoïèse B et T et sur la réponse lymphoproliférative ont été étudiés en association avec la production des cytokines et des immunoglobulines dans le sang.

Afin d'approfondir les précédents résultats obtenus chez des souris soumises à une hypergravité de 2G, une nouvelle expérience de centrifugation a été réalisée. Les mécanismes moléculaires à l'origine de la diminution de la réponse des LB au LPS, précédemment mise en évidence, ont été étudiés.

Enfin, pour discriminer les effets dus aux changements de gravité de ceux induits par une variété de stress chroniques légers, des souris ont été exposées à une combinaison de stress chroniques ultra légers (CUMS). Les conséquences de ce traitement ont été évaluées sur les mêmes paramètres que ceux étudiés lors des expériences de suspension anti-orthostatique.

Pour chacun de ces modèles expérimentaux, un chapitre développera en détails les objectifs ainsi que les méthodes utilisées et présentera les résultats qui seront discutés. Les publications relatives à ce travail sont présentées à la fin de ce manuscrit.

**CHAPITRE 2 : LES EFFETS DE LA
SUSPENSION ANTI-ORTHOSTATIQUE SUR LE
SYSTEME IMMUNITAIRE ADAPTATIF**

Les effets de la micropesanteur simulée sur les lymphocytes de la rate

I. Introduction

Les vols spatiaux induisent un grand nombre de modifications physiologiques. Divers modèles ont été mis au point afin de tenter de reproduire sur Terre les effets observés lors de ces vols. Certains modèles sont utilisés pour étudier les conséquences des modifications de la gravité sur l'organisme. Il est impossible de reproduire la micropesanteur de façon prolongée sur Terre. Cependant, le déplacement des fluides vers le haut du corps [127] ainsi que l'atrophie musculaire et les pertes osseuses [128, 129] observées en micropesanteur peuvent être recréés grâce à différentes méthodes.

La suspension anti-orthostatique est un modèle de micropesanteur simulée mis au point chez le rat et la souris, au début des années 80. Ce modèle validé par la NASA, bien qu'imparfait, permet de reproduire quelques un des principaux effets physiologiques induits par la micropesanteur sur l'organisme [130, 131]. Pour ce faire, les rongeurs sont attachés par la queue avec une inclinaison d'environ 25°, de telle sorte que les pattes postérieures ne supportent aucune charge, les deux pattes antérieures restant en contact avec le sol de la cage [132–134]. Les durées des expérimentations animales peuvent varier de quelques heures à plusieurs semaines. La plupart des expériences ont été réalisées chez le rat sur de courtes durées, entre 2 et 10 jours [135–137]. Les conséquences sur les systèmes cardiovasculaire et musculo-squelettique ont été largement décrites. Dans ce travail, nous nous intéresserons à celles sur le système immunitaire.

L'ensemble des études indique que l'exposition prolongée de rongeurs au modèle de suspension anti-orthostatique entraîne des changements importants au niveau du système immunitaire, pour la plupart comparables à ceux observés chez les astronautes lors de missions de longue durée. Tout d'abord, l'immunité innée est affectée avec notamment une modification de la distribution des leucocytes [107] et une altération de la phagocytose et de la fonction des macrophages [138]. La concentration de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β et l'IL-6, est augmentée dans le sang de souris exposées pendant 8 jours à la suspension, alors que la concentration de l'IL-2 et l'IFN γ est diminuée [139]. Les autres acteurs de la réponse immunitaire sont également altérés. La composition cellulaire des organes lymphoïdes, tels que le thymus et la rate, est modifiée [140]. Plusieurs expériences ont rapporté une réduction significative du nombre de splénocytes associée à une baisse de la réponse proliférative *in vitro*

[135, 141]. De plus, Sonnenfeld *et al.* ont démontré que des souris soumises à la suspension anti-orthostatique étaient moins résistantes aux infections par des bactéries à Gram- [142].

Cependant, ces études ont révélé des contradictions s'expliquant, comme Morey-Holton et Globus l'ont suggéré, par les différences entre les espèces animales utilisées, la durée des expérimentations et surtout par la méthode de suspension [143]. De plus, il n'est pas toujours facile de déterminer si les effets observés sont dus à la position anti-orthostatique, ou au système d'accrochage entraînant une contrainte et un stress chez l'animal. En effet, plusieurs études ont montré que des rats ou des souris attachés en position orthostatique ou même simplement hébergés individuellement dans des cages à suspension pouvaient présenter une réponse au stress ainsi que des modifications de la fonction rénale [144–146].

II. Objectifs de l'étude

Notre étude a eu pour but de préciser les conséquences d'une exposition prolongée à la suspension anti-orthostatique sur les populations lymphocytaires spléniques de souris.

Le premier objectif a été de démontrer que les changements observés n'étaient pas dus au système d'attache, mais bien à la position anti-orthostatique. Pour ce faire, un groupe de souris attachées par la queue, mais en position orthostatique, a été inclus en plus des groupes de souris contrôles et suspendues, pour chacune de nos expériences.

Le second objectif a été de déterminer si les conséquences de la suspension anti-orthostatique sur le système immunitaire étaient associées à un état de stress. En effet, des études ont clairement reliée le stress physiologique, provoqué par une modification de la gravité, aux modifications des paramètres immunitaires [147]. Ainsi, afin de minimiser le stress dû aux conditions expérimentales, nous avons optimisé le système de suspension mis au point par Morey-Holton-Globus [148]. L'involution thymique, le niveau de corticostérone, la concentration en immunoglobulines sériques et la masse corporelle ont été utilisés comme indicateurs de l'état de stress.

Le troisième objectif a été d'évaluer les conséquences de la suspension sur les différentes sous-populations de lymphocytes (LB, LTh et LTc) dans la rate. Nous avons donc utilisé différents marqueurs phénotypiques en cytométrie en flux permettant, d'une part de quantifier les sous-populations, et d'autre part de suivre leur réponse proliférative *in vitro* en utilisant la technique de marquage au CarboxyFluorescein SuccinimidylEster (CFSE). La sécrétion de cytokines a été mesurée dans les sérums des souris et dans les surnageants de culture après stimulation *in vitro* des lymphocytes spléniques.

III. Matériels et méthodes

III.1. Suspension anti-orthostatique

Les expérimentations ont été réalisées avec des souris mâles C57Bl/6N (Laboratoires Charles River) âgées de 8 à 9 semaines. Les souris ont été hébergées dans une armoire ventilée à température contrôlée (Noroit) avec un cycle jour/nuit de 12 h : 12 h et de l'eau et de la nourriture à volonté. Elles ont été placées en groupe de quatre par cage standard durant une semaine après leur arrivée au laboratoire avant d'être isolées de façon aléatoire pour les expérimentations.

Après plusieurs mises au point de la technique de suspension, le protocole suivant a été établi. Chaque groupe expérimental était constitué de 6 souris. Les animaux du groupe Contrôle (C) ont été placés individuellement en cages standards (**Figure 11A**) alors que ceux des groupes Attaché (A) et Suspendu (S) ont été placés individuellement dans des cages pour suspension, fabriquées selon les recommandations de Chapes *et al.* [140], cinq jours avant le début de la suspension. Puis la queue des souris a été entourée d'un pansement adhésif associé à un fil raccordé à une poulie et introduite dans un tube en plastique, afin d'empêcher les souris de se décrocher par la suite. La poulie sur pivot glissant le long de deux tiges a permis un déplacement sur 360° dans la cage. Pour le groupe A, les souris ont été attachées de telle sorte que tous les membres soient en contact avec la grille placée sur la litière, donc en position orthostatique (**Figure 11B**). Pour les souris du groupe S, l'angle de suspension a été fixé à 25° environ de telle sorte que seuls les membres antérieurs touchent la grille, l'individu est alors en position anti-orthostatique (**Figure 11C**). Une poignée de sciure a été ajoutée au-dessus de la grille afin que l'animal puisse faire un nid. Les animaux avaient accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. La durée de la suspension a été fixée à 21 jours. Les expérimentations ont été répétées au moins trois fois.

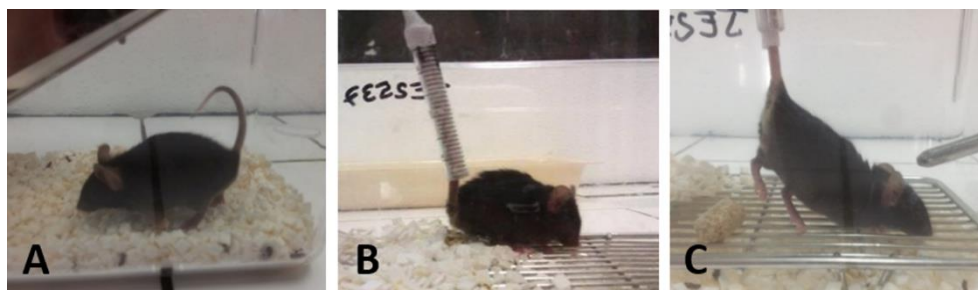


Figure 11 : Photographie des souris isolées pour l'étude avec le modèle de micropesanteur simulée. Les animaux sont séparés aléatoirement, cinq jours avant le début de l'expérimentation, en 3 groupes de 6 souris. **(A)** Les souris du groupe Contrôle ont été placées dans des cages standards. **(B)** Les souris du groupe Attaché ont été attachées par la queue selon le système décrit mais sans suspension. **(C)** Les souris du groupe Suspendu ont été attachées par la queue et suspendues selon un angle d'environ 25°.

Les expérimentations ont été réalisées en accord avec la Législation Nationale (Décret n°2013-11) et la Directive Européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63/UE). Ce protocole a été approuvé par le Comité Régional d’Ethique pour l’Expérimentation Animale : Nancy-Lorraine-Nord-Est (CELM EA-2012-0008).

III.2. Suivi des animaux et recueil des échantillons

Les animaux ont été observés quotidiennement tout au long des 21 jours de suspension. Les cages ont été entièrement changées tous les sept jours. Les souris ont été pesées tous les jours pendant les quatre premiers jours, puis tous les deux jours jusqu’à la fin de l’expérimentation.

Au 21^{ème} jour de la suspension, les souris ont été pesées puis mises à mort par décapitation entre 8h00 et 10h00. Le sang a été récolté et laissé coaguler à température ambiante pendant 15 min, puis le sérum a été recueilli par centrifugation et conservé à -80°C. Le thymus et la rate de chaque animal ont été prélevés et pesés. La rate a été placée immédiatement dans un tube stérile contenant 3 mL de milieu RPMI 1640.

III.3. Analyses des splénocytes par cytométrie en flux

La rate a été dissociée dans du milieu RPMI 1640. Les globules rouges ont été lysés avec 4 mL d’une solution de NH₄Cl 140 mM (eBioscience), puis les cellules nucléées ont été comptées avec un hémocytomètre. Pour analyser les sous-populations lymphocytaires de la rate, 1x10⁶ cellules spléniques ont été incubées pendant 15 min à 4°C et à l’obscurité avec un mélange de quatre anticorps monoclonaux à 0,2 µg chacun : anti-CD19 ECD (clone 6D5, Beckman Coulter), anti-CD3ε APC, anti-CD4 PE et anti-CD8α PE-Cy7 (clones 17A2, RM4-5, 53-6.7, respectivement, eBioscience). L’immunophénotypage a été réalisé en utilisant un cytomètre en flux FC500 (Beckman Coulter). Une première sélection a été réalisée afin d’identifier la population de lymphocytes viables en utilisant une fenêtre basée sur deux paramètres, la taille et la granulosité. Parmi les lymphocytes viables, 50 000 évènements ont été acquis. Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo v7.6.5 (Tree Star Inc.) pour identifier les lymphocytes B CD19⁺ (LB), les lymphocytes T totaux CD3⁺ (LT), les lymphocytes T cytotoxiques CD3⁺CD8⁺ (LTc) et les lymphocytes T auxiliaires CD3⁺CD4⁺ (LTh). Ces populations ont été exprimées en pourcentages de la population lymphocytaire totale et en nombres absolus.

III.4. Etude de la réponse lymphoproliférative par marquage au CFSE

Pour évaluer les réponses prolifératives des lymphocytes, 20×10^6 cellules spléniques contenues dans 1 mL de PBS supplémenté avec 1% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma-Aldrich) ont été mises en contact avec 1 μ L de CFSE à une concentration finale de 5 μ M dans du DMSO (Life Technologies). Après incubation à 37°C pendant 8 min, 2 mL de SVF froid ont été ajoutés pendant 5 min à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec du milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté, 100 U de pénicilline, 100 μ g/mL de Streptomycine et 2 mM de Glutamine (Sigma-Aldrich). Au final, les suspensions cellulaires ont été ajustées à 10×10^6 cellules/mL dans du milieu de culture. Les cellules ont ensuite été distribuées en triplicats de 50 μ L dans les puits d'une microplaque 96 puits contenant 50 μ L de milieu de culture sans ou avec mitogène à une concentration finale de 5 μ g/mL. Le lipopolysaccharide (LPS) d'*Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) ou la Concanavaline A (ConA) de *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich) ont été utilisés pour stimuler les lymphocytes B ou T, respectivement. Les cultures ont été incubées pendant 72 h à 37°C et 5% CO₂. Puis, les surnageants de chaque puits ont été conservés à -80°C et les cellules ont été lavées dans du PBS avant d'être incubées avec le mélange d'anticorps décrit au paragraphe précédent. Les populations lymphocytaires ont été analysées selon les mêmes critères que pour le phénotypage. Pour évaluer le nombre de cellules viables obtenues après stimulation, les pourcentages de variation de chaque sous-population lymphocytaire ont été calculés selon la formule suivante: $[(\% \text{ population stimulée} - \% \text{ population non stimulée}) / \% \text{ population non stimulée}]$. La fluorescence du CFSE a été mesurée pour déterminer la proportion de cellules ayant proliféré parmi les populations lymphocytaires en se focalisant sur les LB CD19⁺ après stimulation au LPS et sur les LTc CD3⁺CD8⁺ ou LTh CD3⁺CD4⁺ après stimulation à la ConA. Le marquage au CFSE a permis de distinguer les cellules restées en génération 0, pour lesquelles la fluorescence en CFSE est à 100%, des cellules s'étant divisées, pour lesquelles la fluorescence est plus faible car le fluorochrome se répartit équitablement entre chaque cellule fille après chaque mitose. Le logiciel d'analyse FlowJo a été utilisé pour déterminer le pourcentage total de cellules s'étant divisées à partir du nombre de cellules et de leur fluorescence pour chacun des pics obtenus après division.

III.5. Dosage des immunoglobulines, de la corticostérone et des cytokines

Les concentrations en IgA, IgG et IgM sériques ont été déterminées selon le protocole du kit Mouse ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories Inc.). La concentration en corticostérone sérique a été mesurée sans procédure d'extraction selon le protocole du kit

ELISA Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays). Dans chaque cas, les concentrations ont été calculées en utilisant une courbe polynomiale d'ordre 4 et exprimées en $\mu\text{g/mL}$ pour les immunoglobulines et en ng/mL pour la corticostérone.

Les concentrations en cytokines dans les sérums et dans les surnageants de culture ont été quantifiées selon le protocole du kit Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix (eBioscience) en utilisant le cytomètre en flux FC500 (Beckman Coulter). La concentration de chaque cytokine a été calculée avec le logiciel FlowCytomix (eBioscience) et a été exprimée en pg/mL . Les limites de détection de chaque analyte sont : GM-CSF 10,9 pg/mL ; IFN γ 6,5 pg/mL ; IL-1 α 15,7 pg/mL ; IL-2 8,8 pg/mL ; IL-4 0,7 pg/mL ; IL-6 2,2 pg/mL ; IL-5 4,0 pg/mL ; IL-10 5,4 pg/mL ; IL-17 2,4 pg/mL ; TNF α 2,1 pg/mL .

III.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS v13.0 (SPSS Inc.). La normalité et l'homogénéité des variances ont été évaluées grâce aux tests de Kolmogorov-Smirnov et Levene. Lorsque les valeurs suivaient une loi normale, les comparaisons des résultats entre les groupes de souris (C, A et S) ont été effectuées avec une analyse des variances ANOVA suivie d'un test *post-hoc* (test de comparaisons multiples) de Tukey. Pour indiquer la tendance et la significativité, les valeurs de $p < 0,10$ et $< 0,05$ ont été respectivement sélectionnées. Toutes les données ont été présentées sous forme de moyennes avec l'erreur standard à la moyenne (ESM).

IV. Résultats

IV.1. Evaluation de l'état de stress après 21 jours de suspension

Afin de suivre l'impact de l'attache et de la suspension, la masse des animaux a été mesurée au cours des 21 jours d'expérimentation. La **figure 12** montre que la masse corporelle des souris contrôles augmente régulièrement tout au long de l'étude. La masse des souris attachées et suspendues diminue durant les 3 premiers jours, puis augmente progressivement. Les souris attachées retrouvent leur masse initiale au 8^{ème} jour de l'expérience, tandis que les souris suspendues ne la retrouvent qu'au 15^{ème} jour. Après 21 jours d'expérimentation, les souris contrôles et attachées ont gagné respectivement 11% et 7% de masse corporelle, alors que les souris suspendues ont seulement retrouvé leur masse initiale, car elles ont de nouveau perdu de la masse corporelle les 4 derniers jours (**Tableau 1**).

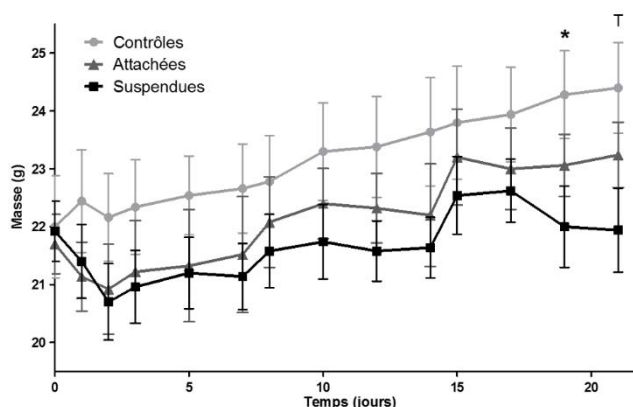


Figure 12 : Évolution de la masse corporelle durant les 21 jours d'expérimentation. Les souris de chaque groupe ont été pesées tous les jours au cours des quatre premiers jours, puis tous les deux jours. $n = 5$ souris par groupe. Chaque groupe a été comparé aux autres. Des différences statistiquement significatives ont été observées après une analyse des variances et un test *post-hoc* de Tukey. ^T $p < 0,1$ et * $p < 0,05$ pour les souris Suspendues versus Contrôles.

Les masses corporelles des souris étant significativement différentes selon les groupes, c'est pourquoi les masses du thymus et de la rate ont été normalisées par rapport à celles-ci (**Tableau 1**). Une involution thymique d'un peu plus de 10% est observée chez les souris attachées et suspendues, mais celle-ci n'est pas statistiquement significative. Les masses relatives des rates des trois groupes sont identiques. Le nombre de cellules nucléées dans la rate est réduit chez les souris attachées et suspendues de 19% et 25%, respectivement, bien que ces différences ne soient pas statistiquement significatives (**Tableau 1**). La concentration de corticostérone dans le sérum a également été mesurée à la fin des 21 jours de l'expérimentation. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les trois groupes, mais une forte variabilité inter-individuelle a été observée (**Figure 13**). L'évolution de la masse corporelle, l'absence d'involution thymique et d'augmentation de la corticostérone indiquent que les souris se sont adaptées aux conditions orthostatiques et anti-orthostatiques.

Individus	Gain de masse (g)	Masse relative du thymus (mg/g)	Masse relative de la rate (mg/g)	Nombre de cellules spléniques nucléées ($\times 10^6$)
Contrôles	+2,40 \pm 0,29	3,10 \pm 0,33	3,04 \pm 0,05	73,9 \pm 15,8
Attachés	+1,54 \pm 0,33	2,66 \pm 0,25	2,91 \pm 0,21	60,1 \pm 10,6
Suspendus	+0,02* [#] \pm 0,46	2,74 \pm 0,22	3,06 \pm 0,21	55,1 \pm 17,4

* $p = 0.032$ versus A, # $p = 0.002$ versus C.

Tableau 1 : Gain de masse, masses relatives des organes lymphoïdes et cellularité splénique après 21 jours d'expérimentation. Le gain de masse corporelle a été calculé selon la formule [poids corporel au jour 21 - poids corporel au jour 0]. Les masses relatives des organes lymphoïdes ont été calculées en rapportant la masse de l'organe à la masse corporelle de chaque souris. Le nombre de cellules spléniques nucléées a été calculé après lyse des globules rouges. $n = 5$ souris par groupe. Chaque groupe a été comparé aux autres. Les données sont des valeurs moyennes \pm ESM. Des différences statistiquement significatives ont été observées après une analyse des variances et un test *post-hoc* de Tukey.

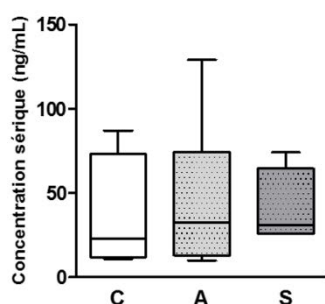


Figure 13 : Concentrations en corticostérone sérique après 21 jours d'expérimentation. La concentration en corticostérone a été mesurée en utilisant un kit ELISA. $n = 4, 6$ et 4 souris pour les groupes Contrôle (C), Attaché (A) et Suspendu (S). Chaque groupe a été comparé aux autres. Aucune différence significative n'a été trouvée après une analyse des variances et un test *post-hoc* de Tukey.

IV.2. Concentrations en immunoglobulines sériques

Après 21 jours d'expérimentation, les concentrations des trois isotypes majeurs d'immunoglobulines sériques ont été mesurées (**Figure 14**), aucune différence n'a été observée entre les 3 groupes de souris.

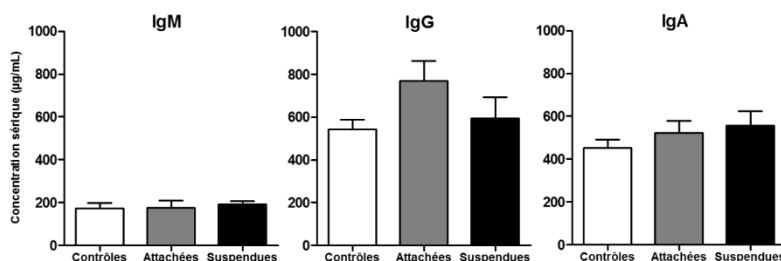


Figure 14 : Concentrations des trois principaux isotypes d'immunoglobulines sériques après 21 jours d'expérimentation. Les concentrations ont été mesurées par ELISA. $n = 5$ souris par groupe. Chaque groupe a été comparé aux autres. Aucune différence significative n'a été observée après une analyse des variances et un test *post-hoc* de Tukey.

IV.3. Populations de lymphocytes B et T dans la rate

Les lymphocytes totaux viables ont été sélectionnés en cytométrie en flux (**Figure 15A**). Comme pour le nombre de cellules nucléées (**Tableau 1**), malgré une légère baisse, aucune différence statistique n'est observée entre les pourcentages des lymphocytes totaux, qui sont de 64,9% et 63,8% pour les souris attachées et suspendues, contre 70,0% pour les souris contrôles (**Figure 16A**). Après avoir calculé les nombres absolus à partir du nombre de cellules nucléées, ces diminutions de 25% et 33% se confirment dans les groupes A et S, mais restent non significatives (**Tableau 2**).

Pour quantifier les sous-populations lymphocytaires, des marqueurs phénotypiques ont été utilisés. Le marqueur CD19 a été utilisé pour identifier les lymphocytes B, le marqueur CD3 pour les lymphocytes T totaux (**Figure 15B**), les marqueurs CD3 et CD8 pour les LTc et les marqueurs CD3 et CD4 pour les LTh (**Figure 15C**).

Les LB CD19⁺ représentent 51,2% des lymphocytes totaux dans les rates des souris contrôles, contre 39,2% et 32,6% dans les rates des souris attachées et suspendues (**Figure 16B**). La proportion de LB diminue significativement de 23% chez les souris attachées et de 36% chez les souris suspendues. De plus, le nombre absolu de LB est diminué de manière significative de 44% pour le groupe A et de 59% pour le groupe S (**Tableau 2**).

La **figure 16B** montre également que dans les groupes A et S, les pourcentages de lymphocytes T totaux (CD3⁺) sont significativement augmentés de 25% et 38%, bien que, contrairement aux LB, le nombre absolu de LT ne change pas (**Tableau 2**). Toutefois, le rapport LB/LT est considérablement diminué. Il passe de 1,2 pour les souris contrôles à 0,5 pour les souris suspendues. Au sein des LT totaux, les pourcentages des cellules CD3⁺CD8⁺ (LTc) et

CD3⁺CD4⁺ (LTh) sont augmentés de 57% et 26% respectivement chez les souris suspendues (Figure 16B), bien que, là encore, les nombres absolus ne varient pas entre les 3 groupes (Tableau 2). Toutefois, le rapport LTh/LTc est réduit de 1,6, pour les souris contrôles, à 1,4 et 1,2 pour les souris attachées et suspendues, respectivement.

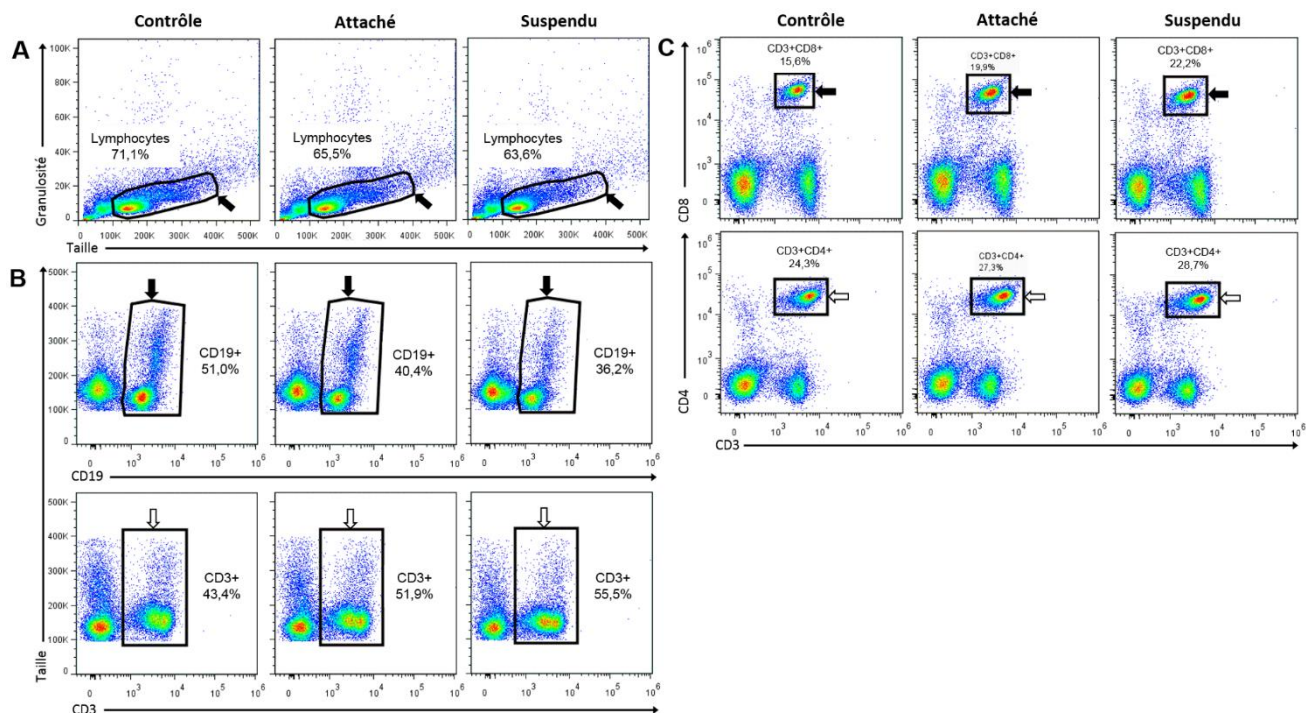


Figure 15 : Exemple d'étude des lymphocytes spléniques à partir des tracés de densité obtenus par cytométrie en flux. Les splénocytes ont été isolés à partir des rates des souris et marqués comme décrit dans la section Matériels et méthodes. Pour chaque souris, les populations de lymphocytes ont été déterminées comme dans les trois exemples présentés ici. L'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel FlowJo. (A) Sélection des lymphocytes totaux viables grâce au profil taille/granulosité (flèche noire). (B) Parmi la population des lymphocytes totaux, les LB CD19⁺ (flèche noire) et les LT CD3⁺ (flèche blanche) ont été sélectionnés dans la fenêtre taille/CD19 et taille/CD3. (C) Parmi la population de lymphocytes, les LTc CD3⁺CD8⁺ (flèche noire) et les LTh CD3⁺CD4⁺ (flèche blanche) ont été sélectionnés avec le profil CD3/CD8 et CD3/CD4.

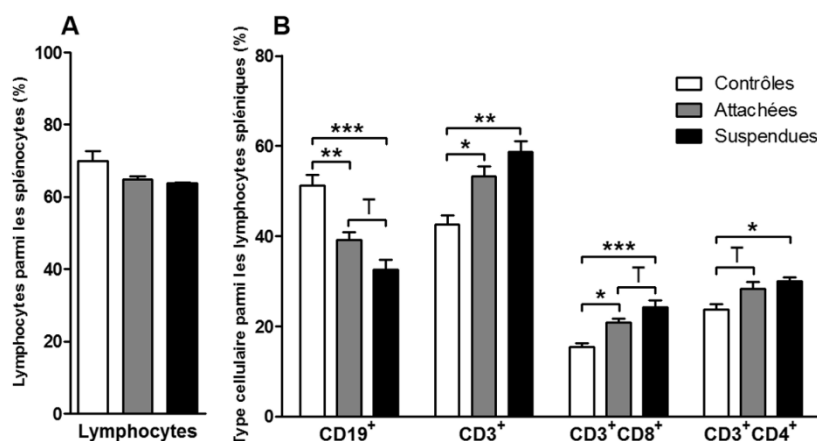


Figure 16 : Phénotypes des lymphocytes spléniques après 21 jours d'expérimentation. Après incubation avec des anticorps fluorescents, les populations cellulaires ont été identifiées par cytométrie en flux. (A) Les lymphocytes totaux viables ont été sélectionnés en utilisant une fenêtre taille/granulosité. (B) Les populations d'intérêt ont ensuite été exprimées comme un pourcentage parmi la population lymphocytaire. $n = 4, 6$ et 4 souris pour les groupes contrôle, attaché et suspendu. Chaque groupe a été comparé aux autres. Des différences statistiquement significatives ont été observées après une analyse des variances et un test *post-hoc* de Tukey. [†] $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Individus	Lymphocytes	CD19 ⁺	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺
Contrôles	52,3 ± 6,3	27,1 ± 4,2	22,0 ± 2,1	8,0 ± 0,7	12,3 ± 1,2
Attachés	39,0 ± 6,9	15,2* ± 2,7	21,1 ± 4,1	8,2 ± 1,5	11,4 ± 2,4
Suspendus	35,1 ± 6,2	11,1 [□] ± 1,3	21,0 ± 4,4	8,8 ± 2,0	10,7 ± 2,1

* $p = 0.039$ versus C; $□ p = 0.011$ versus C.

Tableau 2 : Nombres absolus de lymphocytes totaux et des sous-populations lymphocytaires dans la rate après 21 jours d'expérimentation ($\times 10^6$). Les nombres absolus ont été calculés à partir du nombre de cellules nucléées et des pourcentages obtenus par cytométrie de flux. $n = 4, 6$ et 4 souris pour les groupes contrôle (C), attaché (A) et suspendu (S), respectivement. Chaque groupe a été comparé aux autres. Les données sont des valeurs moyennes \pm ESM. Des différences statistiquement significatives ont été observées après une analyse des variances et un test *post-hoc* de Tukey.

En résumé, ces données mettent en évidence des perturbations dans les proportions et les nombres absolus de lymphocytes. La suspension accroit de façon significative ces modifications par rapport à l'attache orthostatique, inversant le rapport LB/LT et en diminuant le rapport LTh/LTc.

IV.4. Réponse lymphoproliférative après stimulation mitogénique

Après 72 h de stimulation *in vitro* avec du LPS ou de la ConA, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. La **figure 17** présente la méthode utilisée pour l'analyse des résultats. Tout d'abord, une sélection des lymphocytes totaux viables a été appliquée, puis chaque sous-population a été sélectionnée au sein des lymphocytes viables. Puisque les proportions des sous-populations lymphocytaires étaient différentes entre les trois groupes expérimentaux à la fin des 21 jours de traitement (**Figure 16B**) et après 72 h de culture sans

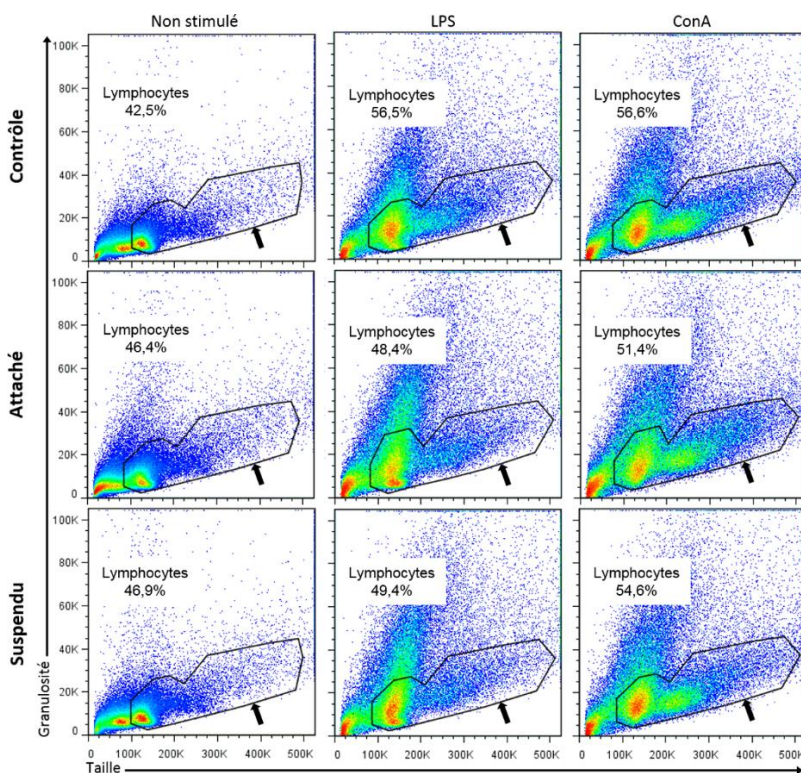


Figure 17 : Exemple de profil des phénotypes lymphocytaires après 72 h de stimulation *in vitro* avec ou sans mitogène. Les splénocytes ont été marqués avec le CFSE et cultivés pendant 72 h avec ou sans mitogène (LPS ou ConA). Pour chaque souris, les lymphocytes issus de la stimulation ont été déterminés comme dans les trois exemples présentés ici. Les cellules ont été marquées avec des anticorps fluorescents et analysées par cytométrie en flux. Les lymphocytes viables (flèche noire) ont été sélectionnés en excluant les cellules mortes et les débris cellulaires selon une fenêtre taille/granulosité.

mitogène (**Fig. 6 de la publication n°1**), afin de comparer avec précision la blastogénèse induite par les mitogènes, nous avons calculé le pourcentage d'augmentation ou de diminution de chaque type cellulaire à l'aide de la formule décrite dans la section Matériels et Méthodes.

Ces calculs ont été effectués pour chaque souris des trois groupes et les résultats sont présentés dans le **tableau 3**. Après stimulation au LPS, la blastogénèse des lymphocytes totaux chez les souris suspendues est significativement diminuée de 60% par rapport aux souris contrôles, alors que pour les souris attachées la diminution n'est pas significative. Cette différence ne se retrouve pas au niveau des LB CD19⁺. Malgré une diminution, allant jusqu'à 27% chez les souris suspendues, du pourcentage de lymphocytes totaux retrouvés après la stimulation à la ConA, les résultats ne sont pas significativement différents par rapport aux souris du groupe C (**Tableau 3**). Pour la population de LT CD3⁺, il n'y a pas de différence entre les souris contrôles et attachées, mais une diminution de 40% est observée chez les souris suspendues, bien que celle-ci ne soit pas significative. Si l'on s'intéresse aux sous-populations de LT, pour les souris suspendues, une baisse de 56% de la blastogénèse des LTc CD3⁺CD8⁺ est observée par rapport aux souris contrôles. De façon surprenante, la population de LTh CD3⁺CD4⁺ a été diminuée de 22% à la fois dans les groupes A et S alors que pour le groupe C aucune augmentation n'a été détectée (**Tableau 3**).

Individus	Stimulation LPS		Stimulation ConA			
	Lymphocytes	CD19 ⁺	Lymphocytes	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺
Contrôles	+41,6 ± 3,3	+12,6 ± 8,1	+40,0 ± 2,1	+73,7 ± 19,3	+139,4 ± 22,1	-2,2 ± 15,7
Attachés	+31,9 ± 7,0	+9,4 ± 2,2	+36,3 ± 6,4	+73,0 ± 11,8	+87,1 ± 26,2	-22,9 ± 18,6
Suspendus	+16,9* ± 6,2	+10,2 ± 4,7	+29,3 ± 3,5	+43,8 ± 12,3	+61,3# ± 20,7	-22,0 ± 14,0

* $p = 0.025$ versus Contrôle. # $p = 0.081$ versus Contrôle.

Tableau 3 : Variations des populations lymphocytaires après 72 h de stimulation mitogénique *in vitro* (%). Les cellules ont été identifiées par cytométrie en flux parmi les lymphocytes viables. La formule [(% de la population stimulée - % de la population non stimulée) / % de la population non stimulée] a été utilisée pour calculer le pourcentage de variation de chaque population cellulaire après stimulation par des mitogènes. $n = 5$ souris par groupe. Chaque groupe a été comparé aux autres. Les données sont des valeurs moyennes ± ESM. Des différences statistiquement significatives ont été observées après une analyse des variances et un test *post-hoc* de Tukey.

Afin d'approfondir ces résultats, les divisions cellulaires de chaque sous-population lymphocytaire ont été évaluées grâce au marquage intracellulaire au CFSE. Dans l'exemple présenté sur la **figure 18**, le nombre de générations calculé par le logiciel FlowJo est similaire entre les groupes expérimentaux, à l'exception des LTh. Pour les LB, après stimulation au LPS, quatre générations de nouveaux LB sont obtenues et de nombreuses cellules sont restées dans la génération 0. Pour les LT totaux, 7 générations sont obtenues après 72 h de stimulation avec la ConA. En outre, le nombre de LT dans la génération 0 est plus faible que pour les LB. Donc la stimulation à la ConA est plus efficace que celle au LPS. Par contre, le nombre de générations

pour les LTh est plus faible, il est de 4 seulement, ce qui confirme en partie les résultats décrits dans le **tableau 3**. D'une façon générale, la répartition des cellules filles entre les générations est différente entre les souris contrôles, attachées ou suspendues selon la sous-population lymphocytaire considérée.

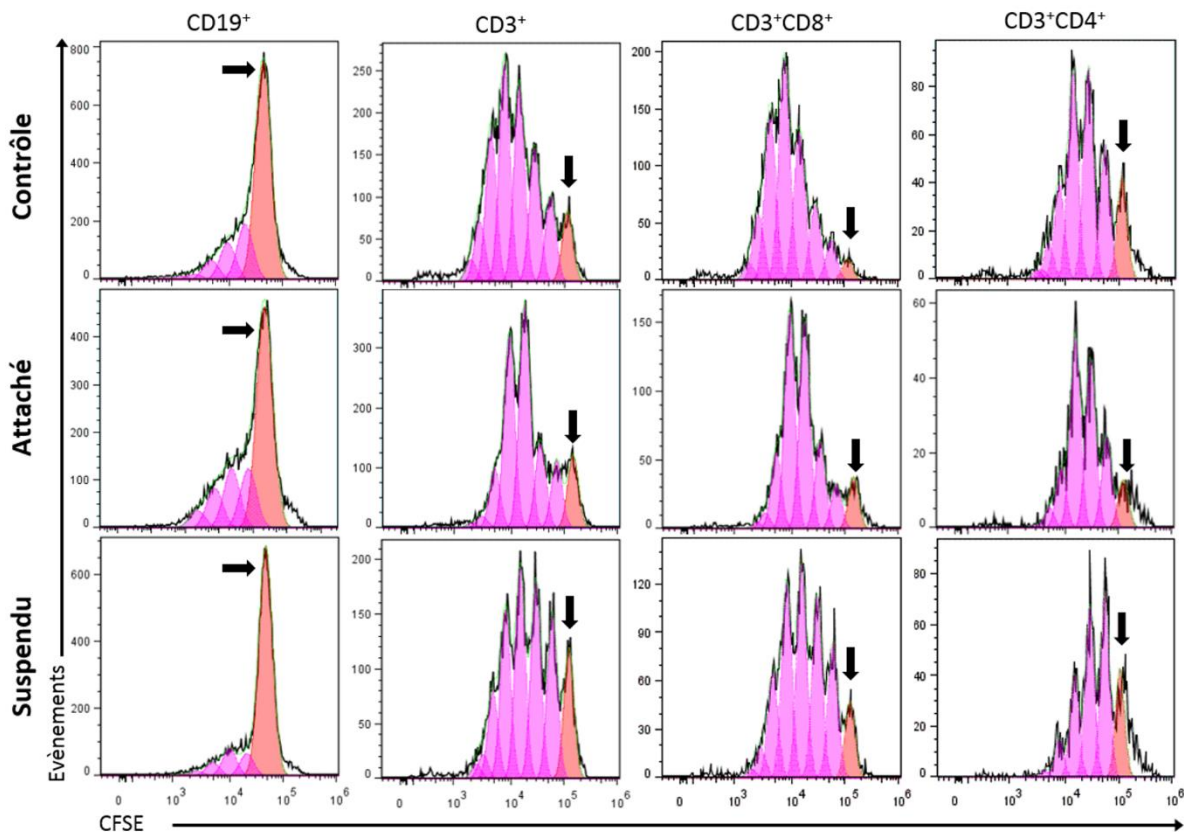


Figure 18 : Etude des divisions lymphocytaires, par marquage au CFSE, après 72 h de stimulation *in vitro* avec un mitogène (LPS ou ConA). Les cellules ont été marquées avec des anticorps fluorescents et analysées par cytométrie en flux. Parmi les lymphocytes viables, chaque sous-population a été sélectionnée comme décrit dans la Figure 15 et traitée pour évaluer les pics de division. La génération 0 (flèche noire) et chacune des générations suivantes (pics roses) ont été utilisés par le logiciel FlowJo pour calculer le pourcentage de cellules ayant proliféré.

Les valeurs moyennes du nombre de cellules s'étant divisées sont présentées dans la **figure 19** pour les trois groupes de souris. Le pourcentage de cellules retrouvées après stimulation avec du LPS est plus faible que celui après stimulation avec de la ConA. De plus, comme pour les résultats précédents, l'attache orthostatique a un effet négatif sur la réponse lymphoproliférative, bien qu'il soit non significatif et cet effet négatif est plus important chez les souris suspendues. En effet, la suspension entraîne une diminution significative de 32% et de 40% des LB CD19⁺ par rapport aux groupes A et C, respectivement (**Figure 19A**). Les réponses prolifératives des LT CD3⁺, LTc et LTh sont diminuées de 18%, 14% et 23% chez les souris suspendues par rapport au groupe C (**Figure 19B**), mais ces variations ne sont pas statistiquement significatives.

L'ensemble de ces résultats montre que la position orthostatique a un effet négatif sur la réponse lymphoproliférative et que la suspension anti-orthostatique renforce cet effet. De plus, les LB sont beaucoup plus affectés que les LT, leur nombre et leur réponse au LPS sont significativement diminués.

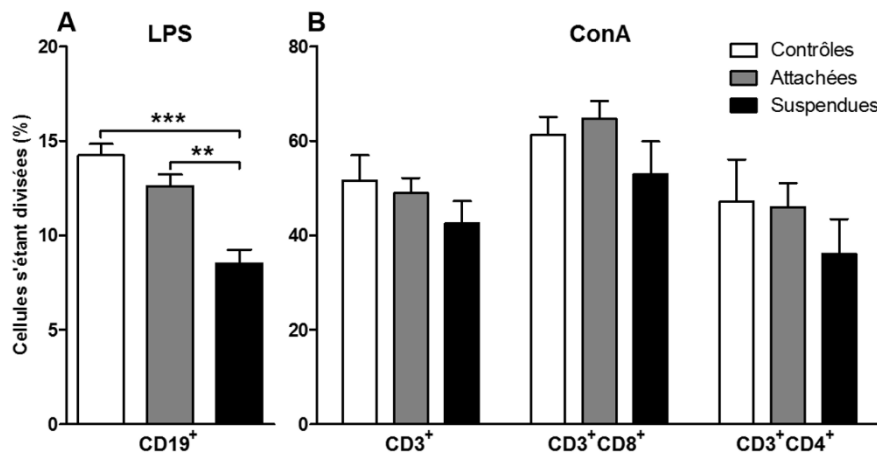


Figure 19 : Pourcentages de lymphocytes ayant proliférés après 72 h de stimulation mitogénique *in vitro*. La culture *in vitro* des splénocytes marqués au CFSE a permis l'analyse des divisions des LB, LT, LTc et LTh en réponse à une stimulation mitogénique. **(A)** Pourcentages de LB CD19⁺ ayant proliféré en réponse au LPS. **(B)** Pourcentages de LT totaux CD3⁺, LTc CD3⁺CD8⁺ et LTh CD3⁺CD4⁺ ayant proliféré en réponse à la ConA. *n* = 5 souris par groupe. Chaque groupe a été comparé aux autres. Des différences statistiquement significatives ont été observées après une analyse des variances et un test *post-hoc* de Tukey. ** *p* < 0,005; *** *p* < 0,001.

IV.5. Concentrations des cytokines sériques et dans les surnageants

En premier lieu, il convient de noter qu'aucune des 10 cytokines étudiées n'a pu être quantifiée dans le sérum des souris, car les seuils de détection du kit utilisé n'étaient pas assez bas. Cependant, ce résultat montre qu'il n'y a pas de changement majeur des concentrations sériques de ces cytokines.

Pour déterminer si l'effet négatif de l'attache ou de la suspension sur la réponse lymphoproliférative a donné lieu à l'activation différentielle de la production de certaines cytokines, celles-ci ont été dosées après 72 h de culture des lymphocytes avec du LPS ou de la ConA. Concernant les cytokines induites par le LPS, les concentrations d'IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5 et IL-17 sont très faibles, puisqu'en dessous du seuil de détection du kit. La **figure 8 de la publication n°1** montre les concentrations des cinq autres cytokines. Malgré quelques différences, ces résultats ne sont pas significatifs. La **figure 9 de la publication n°1** montre les concentrations des six cytokines qui ont été détectées dans les surnageants de culture après 72 h de stimulation avec de la ConA. Les concentrations d'IL-1 α , IL-2, IL-4 et IL-10 sont très faibles et aucune différence significative n'a été observée pour les cinq autres cytokines entre les trois groupes expérimentaux.

V. Discussion

Nos résultats montrent que les souris attachées, comme celles en suspension, ont perdu du poids pendant les trois premiers jours de l'expérimentation, mais elles se sont ensuite adaptées aux traitements comme l'indique la reprise de poids dès le quatrième jour. De précédentes études ont montré que la suspension anti-orthostatique, ou un séjour prolongé dans l'espace, entraînent également une réduction significative de la masse corporelle [105, 106, 134]. Cette perte de poids est très probablement induite par la diminution de la prise alimentaire au début de la suspension, comme Morey-Holton et Globus l'ont suggéré [143]. De plus, Tsvirkun *et al.* [146] ont observé une augmentation de l'activité locomotrice au cours d'expériences de suspension et Momken *et al.* [149] ont rapporté une augmentation de la dépense énergétique chez les rats suspendus pendant 14 jours. Une évaluation de la concentration en leptine dans le sérum des souris au cours de l'expérience serait particulièrement intéressante pour compléter cette étude. En effet, cette protéine est une des plus importantes hormones sécrétées par les adipocytes et sa réduction dans le sérum conduit à des changements neuroendocriniens et de comportement alimentaire qui ont pour but de préserver les réserves énergétiques pour les fonctions vitales [150]. Sa concentration est diminuée d'environ 50% dans le sérum de rongeurs soumis à une restriction alimentaire ou exposés à la suspension anti-orthostatique pendant plusieurs semaines [151]. Les mêmes observations ont été faites chez les astronautes qui subissent une forte perte osseuse et une baisse de la prise alimentaire au cours des missions spatiales [152, 153]. De plus, un faible taux de leptine peut entraîner une diminution de l'hématopoïèse et de l'immunité spécifique, des récepteurs étant présents sur les LT et LB [154, 155].

Par ailleurs, la position anti-orthostatique n'a pas modifié les masses relatives de la rate et du thymus. Nos données sont en accord avec celles de Felix *et al.* [139], qui n'ont observé aucune différence entre les poids des organes lymphoïdes de souris contrôles et suspendues, alors que Caren *et al.* [156] ont remarqué une atrophie splénique après 22 jours de suspension chez le rat. En fait, l'effet de la modification de la pesanteur sur le poids des organes varie selon les études [103, 105, 157]. Cette disparité dans les observations pourrait s'expliquer par la variabilité des conditions expérimentales. En effet, dans leur revue, Morey-Holton et Globus [143] ont souligné l'importance du contrôle des paramètres expérimentaux, notamment du système de traction, dans le maintien d'un faible niveau de stress pour les animaux. Dans notre cas, la concentration de corticostérone et la masse du thymus, similaires dans les trois groupes

de souris à la fin de l'expérience, attestent de l'adaptation des animaux aux conditions de suspension grâce à l'amélioration du système de fixation.

Nos résultats montrent que le nombre total de cellules spléniques est diminué de 20% chez les souris attachées et de 25% chez les souris suspendues. Bien que ces résultats ne soient pas statistiquement significatifs, ils vont dans le même sens que ceux de Wei *et al.* [141] qui ont observé une diminution d'environ 50% du nombre de splénocytes, dès la deuxième journée de suspension, médiée par l'apoptose provoquée par le stress au début de l'expérience. En effet, la réponse au stress médiée par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et le système nerveux sympathique (SNS) est connue pour provoquer l'apoptose des lymphocytes. D'autre part, la position anti-orthostatique provoque un déplacement des fluides vers la tête, pouvant expliquer également la redistribution cellulaire [130]. La rate étant abondamment innervée [158], la réduction du nombre de splénocytes pourrait avoir lieu suite à l'activation du SNS, entraînant la sécrétion de catécholamines induisant la mort cellulaire au début de la suspension, comme Wei *et al.* l'ont suggéré [141]. Enfin, Montez *et al.* ont montré qu'une déficience en leptine entraînait une forte diminution du nombre de splénocytes chez la souris [159].

L'analyse par cytométrie en flux a révélé que les sous-populations lymphocytaires sont modifiées dans les rates des souris attachées et suspendues, avec un effet plus important pour le groupe suspendu. Nos résultats montrent que la proportion de LB CD19⁺ a diminué chez les souris exposées à la suspension. Le nombre absolu de LB est considérablement réduit, d'environ 60%, dans la rate des souris suspendues tandis que le nombre absolu de LT est resté inchangé. De ce fait, le rapport LB/LT baisse de 50%. Au sein des LT, le rapport LTh/LTc passe de 1,6 à 1,2 chez les souris suspendues, car le nombre de LTh diminue alors que celui des LTc ne varie pas. Plusieurs études ont montré des changements dans les sous-populations de lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires après une exposition à la micropesanteur simulée ou un séjour dans l'espace. Cependant, ces résultats sont parfois contradictoires et dépendent du type d'organe lymphoïde étudié et de la méthode de marquage des cellules nécessaire à leur détection. En effet, Wang *et al.* ont montré que les LT immatures diminuent dans le thymus et que les LT et LB matures diminuent dans la rate de souris suspendues [136], alors que nos données sont en accord avec celles d'O'Donnell *et al.* [137]. Ceux-ci ont observé des changements similaires dans les sous-populations lymphocytaires dès 18 h après le début de la procédure de suspension. Il semble donc que la redistribution des cellules dans la rate ait lieu dès le début de la suspension et persiste tout au long de la procédure. Plusieurs hypothèses

peuvent expliquer ces modifications. La première hypothèse serait une libération de LB de la rate consécutive à des modifications d'expression de molécules d'adhésion. La seconde hypothèse pourrait être une plus grande sensibilité des LB à l'apoptose par rapport aux LT. En effet, Wei *et al.* [141] ont montré que la lymphopénie induite par la suspension est due, au moins en partie, à l'apoptose. La troisième hypothèse serait un affaiblissement de la lymphopoïèse B entraînant la réduction du nombre de LB. De nouvelles études sont donc nécessaires pour déterminer si ces modifications sont associées à des changements dans l'expression des molécules d'adhésion et/ou la sécrétion de chimiokines, comme cela a été montré chez des rongeurs après un vol spatial [160] ou après une exposition à l'hypergravité [126]. De plus, il serait intéressant de déterminer plus précisément quel type de cellules B de la rate est affecté dans ces conditions, ceux de la zone marginale ou ceux de la zone folliculaire. Chacun d'entre eux étant spécialisé dans des mécanismes de défense particuliers, les conséquences d'une diminution d'une population particulière seraient différentes pour l'organisme.

L'étude de la réponse lymphocytaire montre qu'il y a moins de lymphocytes totaux qui se divisent *in vitro* en présence de mitogène, LPS ou ConA, pour les groupes attaché et suspendu. Ces résultats sont comparables à ceux d'autres études menées sur des rongeurs exposés à la suspension ou à un vol spatial [103, 106, 135, 161]. Cependant, dans ces études, la durée de la stimulation des lymphocytes totaux était plus courte, et les méthodes d'analyse de prolifération, telle que la thymidine tritiée, ne permettaient pas de distinguer les sous-populations lymphocytaires. Nous avons donc utilisé le marquage au CFSE pour quantifier précisément les sous-populations lymphocytaires qui se sont divisées. Une diminution importante, de l'ordre de 40%, a été notée pour les LB stimulés 72 h avec du LPS chez les souris suspendues. Ces résultats pourraient donc expliquer pourquoi des souris suspendues infectées par *P. aeruginosa* ou *K. pneumoniae* présentent un taux de mortalité augmenté comme l'ont montré Sonnenfeld *et al.* [142, 162]. En ce qui concerne les LT totaux, LTc et LTh, là aussi une diminution de la réponse à la ConA a été observée après la suspension. Par contre, les variations ne sont pas statistiquement significatives, donc les LT semblent moins affectés que les LB. La diminution de la réponse mitogénique des LT en gravité modifiée a été largement documentée [133, 163–165]. Cependant, il est important de noter que dans ces études, à la différence d'autres expériences [112, 142, 166], les changements cellulaires étaient associés à une augmentation de la concentration de corticostérone ; les animaux étaient donc encore en état de stress. Ici, nos résultats montrent que les souris se sont adaptées à la suspension comme

les souris qui ont été exposées à 21 jours d'hypergravité à 2G [126]. Les conséquences sur les lymphocytes sont donc bien dues à la micropesanteur simulée et non à un état de stress chronique.

Aucune différence significative entre les dix cytokines mesurées n'a pu être détectée dans les surnageants de culture. Ces résultats sont en accord avec Nash *et al.* [167], qui a montré que la capacité des lymphocytes stimulés par un mitogène à sécréter de l'IL-2 et de l'IL-1 n'est pas affectée par 7 jours de suspension anti-orthostatique ou après un vol spatial. Par contre, certains auteurs ont suggéré que la balance Th1/Th2 pourrait être modifiée dans le sérum des astronautes [168], ce que nous n'avons pas pu observer chez nos souris. La régulation des cytokines est un processus complexe et subtile [169], c'est pourquoi les résultats sont délicats à interpréter. En outre, le temps d'incubation de 72 h, nécessaire à l'étude de la prolifération des cellules avec le CFSE, est très probablement trop long pour détecter des modifications des cytokines, qui sont sécrétées pendant les premières heures après la stimulation cellulaire. D'autres expériences, comme une quantification des cytokines intracellulaires, permettront de compléter cette étude et peut-être de confirmer le changement Th1 vers Th2.

En conclusion, nos résultats démontrent que la position anti-orthostatique a des effets supérieurs à ceux de la contrainte orthostatique. Ces données montrent, pour la première fois, que non seulement la suspension anti-orthostatique inverse le rapport LB/LT dans la rate, mais affecte aussi de façon différentielle les réponses spécifiques des cellules en l'absence de stress. Les LB sont plus sensibles à la micropesanteur simulée que les LT, de même que les LTh sont plus sensibles que les LTc. Ainsi, la suspension pourrait induire une perturbation dans l'homéostasie de l'immunité humorale. Ce changement pourrait augmenter la susceptibilité à de nombreux agents pathogènes, tels que les bactéries à Gram-, et compromettre les défenses des astronautes. Si tel était le cas, cela pourrait représenter un risque pour la santé en augmentant la susceptibilité aux maladies liées à une baisse de l'immunité à médiation cellulaire [83].

Afin d'expliquer la diminution des lymphocytes B dans la rate des souris suspendues et la baisse de leur réponse proliférative, nous nous sommes intéressés ensuite à la lymphopoïèse chez ces animaux, puis aux voies d'activation des lymphocytes.

Les effets de la suspension anti-orthostatique sur les lymphopoïèses B et T

I. Introduction

Le modèle de suspension anti-orthostatique de rongeurs induit une décharge des membres postérieurs [122], entraînant une diminution de la masse osseuse au niveau de ces membres associée à une baisse de la différenciation ostéoblastique et à une production accrue d'adipocytes dans la moelle. De plus, ce modèle conduit également à des changements immunologiques proches de ceux rencontrés lors de vols spatiaux [170–173]. En effet, dans la partie précédente, nous avons démontré que les lymphocytes B sont fortement affectés par la suspension qui induit la diminution de leur nombre dans la rate des souris et de leur réponse proliférative [174].

Une de nos hypothèses était que la suspension anti-orthostatique, induisant de profondes altérations du métabolisme osseux, pourrait affecter l'hématopoïèse. Un certain nombre d'observations antérieures confortent cette hypothèse. En effet, une diminution du nombre de progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse a été observée à la fois après un vol spatial et après une suspension anti-orthostatique [94, 175–177]. La culture *in vitro* de progéniteurs humains CD34⁺ de la moelle osseuse en vol a confirmé l'effet inhibiteur de la micropesanteur sur l'érythropoïèse et la myélopoïèse [178]. Plus récemment, Ortega *et al.* ont signalé des changements dans la maturation et l'activation des granulocytes dans la moelle osseuse de souris C57Bl/6 après un vol spatial de 13 jours [100]. Malgré toutes les publications portant sur les dysfonctionnements immunitaires induits lors d'un vol spatial, relativement peu d'études ont analysé l'effet de la micropesanteur sur la réponse humorale et la différenciation des lymphocytes B. Nous avons récemment montré que l'expression de la chaîne lourde des IgM et du facteur de transcription Ikaros, déterminant la voie lymphoïde, est modifiée lorsque des embryons d'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl* sont soumis à des variations de gravité, ce qui suggère une modification de la lymphopoïèse B [121]. Par contre, nous n'avons pas observé d'involution thymique chez les souris suspendues malgré un impact de la suspension sur la réponse proliférative des lymphocytes T [174] et aucune étude de la lymphopoïèse T n'a été réalisée à ce jour. Enfin, concernant les populations lymphocytaires B et T, il n'y a pas d'étude portant sur l'évolution de leur réponse lymphoproliférative au cours de plusieurs semaines de suspension.

II. Objectifs de l'étude

Notre étude a donc eu pour but d'analyser la lymphopoïèse B et T chez des souris soumises à une suspension anti-orthostatique. Comme nous avons précédemment démontré un effet spécifique de la position anti-orthostatique, le groupe de souris attachées n'a pas été conservé pour cette étude.

Le premier objectif a été de suivre au cours de la suspension les masses corporelles, du thymus et de la rate et de mesurer les taux de corticostérone sérique, afin de déterminer l'état de stress des animaux, ainsi que les concentrations d'immunoglobulines sériques.

Le second objectif a été de déterminer, au niveau des pattes postérieures, l'impact du remodelage osseux induit par ce modèle sur la maturation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) vers la lignée B. Pour cela, nous avons analysé la lymphopoïèse B et étudié l'expression de facteurs de transcription lymphoïdes, ainsi que la phosphorylation de STAT5 en réponse à l'IL-7, qui joue un rôle crucial dans le développement précoce des progéniteurs lymphoïdes communs et des cellules pro-B.

Le troisième objectif a été d'étudier la lymphopoïèse T dans le thymus au cours de la suspension.

Enfin, les proportions des lymphocytes B et T matures dans la rate et leur réponse lymphoproliférative ont été étudiées au cours des 21 jours de suspension anti-orthostatique pour obtenir des données complémentaires sur l'évolution de la réponse proliférative des lymphocytes pendant la suspension.

Les matériels et méthodes et les figures des analyses réalisées par nos collaborateurs de Saint-Louis sont détaillés dans la *publication n°2*.

III. Matériels et méthodes

III.1. Suspension anti-orthostatique

Les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec la Législation Nationale (Décret n°2013-11) et la Directive Européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63/UE). Ce protocole a été approuvé par les Comités Régionaux d'Ethiques pour l'Expérimentation Animale : Paris Lariboisière-Villemin (numéro d'agrément : CEEALV/2010-03-06) et Nancy-Lorraine-Nord-Est (CELMEA-2012-0008).

Les expérimentations ont été réalisées avec des souris mâles C57Bl/6J (Laboratoires Janvier) âgées de 12 semaines. Avant le début des expériences, les souris ont été placées par

groupes de quatre souris dans des cages standards pendant une semaine après leur arrivée. Les souris ont été hébergées dans une armoire ventilée à température contrôlée (Noroit) avec un cycle jour/nuit de 12 h : 12 h et de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Chaque groupe était constitué de 12 souris. Les souris ont été isolées de façon aléatoire cinq jours avant le début de l'expérience en cages standards ou en cages pour suspension. Le protocole de suspension est détaillé dans le paragraphe III.1 (page 37). Les souris contrôles (C) et suspendues (S) ont été hébergées individuellement dans des cages identiques (**Figure 20**). Les expériences ont été répétées deux à cinq fois pour chaque temps étudié.



Figure 20 : Photographie d'une cage en polycarbonate équipée pour la suspension anti-orthostatique murine. L'individu est suspendu selon un angle d'environ 25°. Un système de poulie sur pivot permet un déplacement à 360° sur la grille couvrant la litière.

III.2. Suivi des animaux et recueil des échantillons

Les animaux ont été observés quotidiennement tout au long des 21 jours de suspension. Les souris ont été pesées chaque jour. Les cages ont été entièrement changées tous les sept jours.

Aux jours 3, 6, 13 et 21 de la suspension, 3 souris contrôles et 3 souris suspendues ont été mises à mort par décapitation entre 8h00 et 10h00. Le sang a été récolté et laissé coaguler à température ambiante pendant 15 min, puis le sérum a été recueilli par centrifugation et conservé à -80°C. Le thymus et la rate de chaque animal ont été prélevés et placés immédiatement dans un tube stérile contenant 3 mL de milieu RPMI 1640, puis pesés.

III.3. Analyses des cellules de la lignée B et T par cytométrie en flux

La rate et le thymus ont été dissociés dans du RPMI 1640. La préparation cellulaire et l'étude immunophénotypique par cytométrie en flux ont été réalisées comme indiqué au paragraphe III.3 précédent (page 38). Les populations lymphocytaires thymiques et spléniques ont été exprimées en pourcentages de la population cellulaire totale.

Les progéniteurs hématopoïétiques précoces et les cellules de la lignée B dans la moelle osseuse ont été quantifiés chez les souris contrôles et suspendues par cytométrie en flux comme décrit au *paragraphe 4 du Matériels et méthodes de la publication n°2*.

III.4. Etude de la réponse lymphoproliférative par marquage au CFSE

Les réponses prolifératives des lymphocytes spléniques ont été étudiées comme décrit au paragraphe III.4 précédent (page 39). La fluorescence du CFSE a été mesurée pour déterminer la proportion de cellules ayant proliféré parmi les populations lymphocytaires en se focalisant sur les LB CD19⁺, après stimulation au LPS, et sur les LTc CD3⁺CD8⁺ ou LTh CD3⁺CD4⁺, après stimulation à la ConA. A partir de la génération 0, le logiciel FowJo a déterminé le pourcentage de cellules s'étant divisées.

III.5. Dosage des immunoglobulines et de la corticostérone

Les concentrations en IgA, IgG et IgM sériques ont été déterminées selon le protocole du kit Mouse ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories Inc.). La concentration en corticostérone sérique a été mesurée sans procédure d'extraction selon le protocole du kit ELISA Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays). Dans chaque cas, les concentrations ont été calculées en utilisant une courbe polynomiale d'ordre 4 et exprimées en µg/mL pour les immunoglobulines et en ng/mL pour la corticostérone.

III.6. Test de formation de colonies

Le sang de certains individus a été prélevé par ponction ventriculaire avant la mise à mort. La préparation et la stimulation des cellules ont été réalisées selon le protocole cité dans le *paragraphe 5 du Matériels et méthodes de la publication n°2*. Le nombre de colonies formées (CFU) a été déterminé après 12 jours.

III.7. Marquage intracellulaire de STAT5 phosphorylé

Des cellules de moelle osseuse ont été déplétées en cellules IgM⁺ par séparation magnétique. Ensuite, les cellules IgM⁻ ont été enrichies en cellules CD19⁺ par tri cellulaire. Les cellules IgM⁻CD19⁺ ont ensuite été stimulées avec de l'IL-7 recombinante, puis marquées en intracellulaire selon le protocole cité dans le *paragraphe 6 du Matériels et méthodes de la publication n°2*. Les cellules IgM⁻CD19⁺ purifiées ont été sélectionnées dans la population B220^{lo}CD43⁺ et le pourcentage de cellules phospho-STAT5⁺ a été déterminé.

III.8. PCR quantitative

L'expression de facteurs de transcription a été étudiée dans les progéniteurs lymphoïdes précoces isolés à partir des souris contrôles et des souris soumises à 6 jours de suspension. Les PCR quantitatives ont été effectuées en utilisant les TaqMan Gene Expression Assays (Applied

Biosystems) cités dans le *paragraphe 7 du matériels et méthodes de la publication n°2* à partir d'ARN extraits avec le kit RNeasy Micro (Qiagen) et transformés en ADNc avec le kit SuperScript III (Invitrogen) et des hexamères aléatoires.

III.9. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS v13.0 (SPSS Inc.). La normalité et l'homogénéité des variances ont été évaluées grâce aux tests de Kolmogorov-Smirnov et Levene. Lorsque les valeurs suivaient une loi normale, les comparaisons des résultats entre les groupes de souris ont été effectuées avec un test de Student. Quand les données n'étaient pas distribuées selon une loi normale, les comparaisons ont été effectuées avec un test de Mann-Whitney. Pour indiquer la tendance et la significativité, les valeurs de $p < 0,10$ et $< 0,05$ ont été respectivement sélectionnées. Toutes les données ont été présentées sous forme de moyennes avec l'erreur standard à la moyenne (ESM).

IV. Résultats

IV.1. Evaluation de l'état de stress au cours de la suspension

L'évolution de la masse corporelle a été étudiée au cours des 21 jours d'expérimentation. La masse corporelle des souris suspendues diminue durant les premiers jours (**Figure 21**). Ensuite, les souris suspendues reprennent leur masse initiale au 4^{ème} jour qui reste inférieure à celle des souris contrôles jusqu'à la fin de l'expérience. De plus, les souris suspendues perdent à nouveau de la masse corporelle à partir du 13^{ème} jour, jusqu'à atteindre une perte de 6% à la fin de l'expérimentation.

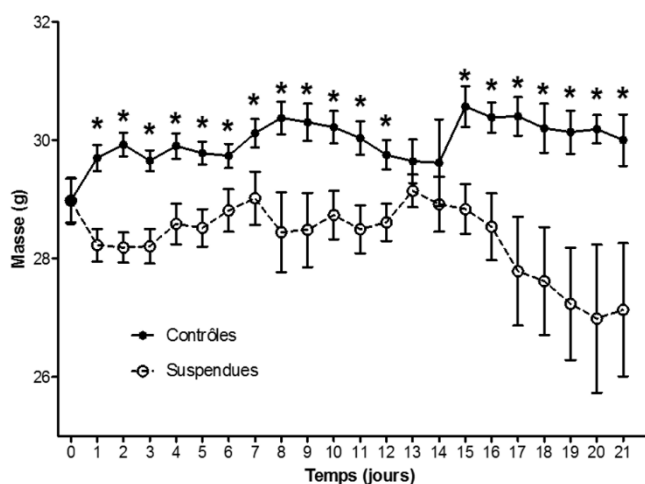


Figure 21 : Évolution de la masse corporelle durant la suspension. Les souris de chaque groupe ont été pesées tous les jours. $n = 24$ de J0 à J3, $n = 18$ de J4 à J6, $n = 12$ de J7 à J13 et $n = 6$ de J14 à J21. Des différences statistiquement significatives ont été observées après un test de Student. * $p < 0,05$.

La masse relative du thymus ne diffère pas entre les souris contrôles et suspendues durant les 21 jours de suspension (**Figure 22**). La masse relative de la rate reste similaire également entre les deux groupes expérimentaux.

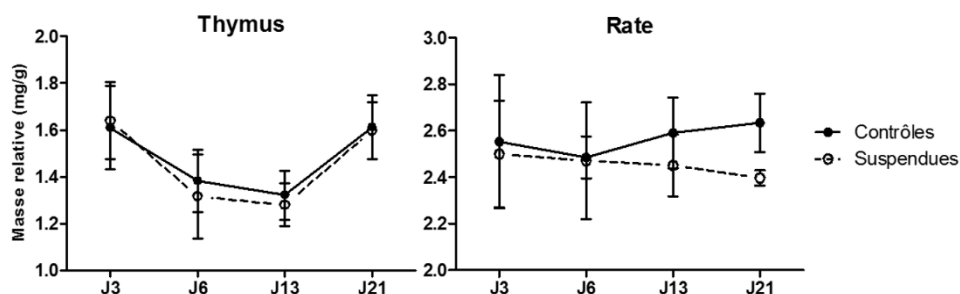


Figure 22 : Évolution des masses relatives des organes lymphoïdes durant la suspension. Les masses relatives des organes lymphoïdes ont été calculées en rapportant la masse de l'organe à la masse corporelle de chaque souris. $n = 6$ souris à chaque point de mesure. Aucune différence significative n'a été observée après un test de Student.

Les concentrations de corticostérone sérique de chacun des groupes expérimentaux sont restées similaires tout au long des 21 jours de suspension et proches des valeurs physiologiques normales (**Figure 23**).

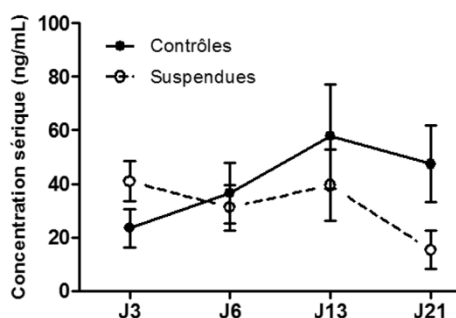


Figure 23 : Évolution de la concentration en corticostérone sérique durant la suspension. La concentration en corticostérone a été mesurée en utilisant un kit ELISA. $n = 6$ souris à chaque point de mesure. Aucune différence significative n'a été observée après un test de Student.

L'ensemble de ces données montre que les souris se sont adaptées à la suspension après 3 jours et confirment les résultats obtenus précédemment avec des souris de 2 mois (page 40).

IV.2. Concentrations en immunoglobulines sériques

Durant les 21 jours d'expérimentation, les concentrations des trois isotypes majeurs d'immunoglobulines sériques ont été mesurées (**Figure 24**), aucune différence n'a été observée entre les 2 groupes de souris quel que soit le point de mesure.

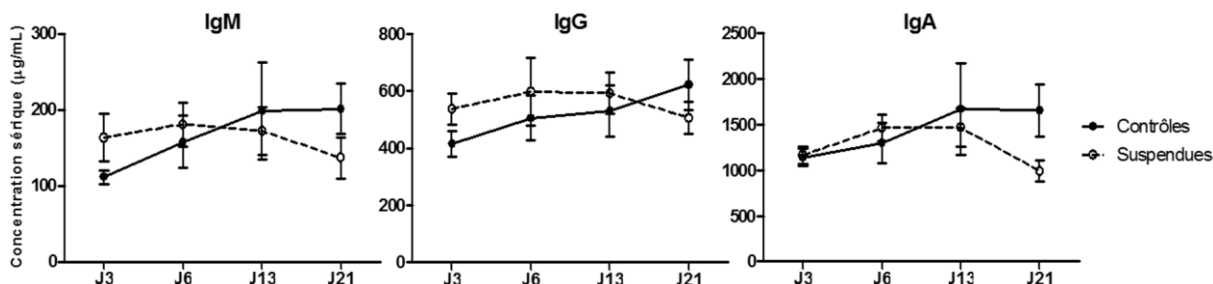


Figure 24 : Évolution de la concentration des trois principaux isotypes d'immunoglobulines sériques durant la suspension. Les concentrations ont été mesurées par ELISA. $n = 6$ souris à chaque point de mesure. Aucune différence significative n'a été observée après un test de Student.

IV.3. Architecture du fémur et cellules souches hématopoïétiques

Les résultats présentés dans la **figure 1A de la publication n°2** montrent que l'architecture de l'os est modifiée chez les souris suspendues avec une diminution significative du volume trabéculaire osseux et du nombre de travées à partir du 6^{ème} jour.

Afin de déterminer si ces modifications de l'os trabéculaire induites par la suspension affectent la lymphopoïèse B, des cultures de cellules sanguines dans du milieu à base de méthylcellulose contenant des cytokines ont été réalisées. Ces cultures ont produit plus de CFU chez les souris soumises à une suspension (**Fig. 2A de la publication n°2**). La suspension conduit donc à une libération accrue de progéniteurs hématopoïétiques dans la circulation.

IV.4. Lymphopoïèse B

Les cellules souches hématopoïétiques et les cellules de la lignée B ont été quantifiées dans les fémurs des souris. Une diminution significative de la fréquence des progéniteurs lymphoïdes précoces (CLP) et des cellules engagées dans la voie B a été observée dès le troisième jour de la suspension. Ces diminutions se sont maintenues tout au long des 21 jours de l'expérimentation (**Fig. 2B de la publication n°2**). La plus forte diminution a été observée pour les cellules pré-B qui sont réduites de 5 à 10 fois chez les souris suspendues. Ces données démontrent que la suspension induit une diminution de la lymphopoïèse B.

Afin d'identifier les causes moléculaires de ces observations, des transcrits codant différents facteurs de transcription ont été quantifiés. Ces quantifications ont mis en évidence une diminution des transcrits de *Ebfl* et *Pax5* de 2 à 3 fois dans les cellules CLP des souris suspendues (**Fig. 4A de la publication n°2**). La diminution de la lymphopoïèse B est donc associée à une diminution de l'expression de deux facteurs de transcription (EBF1 et PAX5) requis pour le développement de la lignée B.

L'impact de la suspension sur l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (IL-7R α) et sur la phosphorylation de STAT5 requise pour la transduction du signal a été évalué. Les résultats de la **figure 4B de la publication n°2** montrent que l'expression de l'IL-7R α à la surface des cellules pro-B est similaire chez les souris contrôles et suspendues. En revanche, une diminution de la phosphorylation de STAT5 a été observée après stimulation des cellules pro-B avec de l'IL-7 chez les souris suspendues (**Fig. 4C et 4D de la publication n°2**).

Ces résultats montrent que la diminution de la lymphopoïèse B induite par la suspension anti-orthostatique est associée à la fois à une moins bonne signalisation médiée par STAT5 et à une diminution de l'expression de facteurs de spécification et d'engagement des cellules vers la lignée B.

IV.5. Lymphopoïèse T

Les sous-populations de thymocytes ont été étudiées par cytométrie en flux. Ces sous-populations ont été déterminées au sein des thymocytes viables en utilisant d'abord les marqueurs CD4 et CD8, puis en ajoutant le marqueur CD3 aux populations sélectionnées (**Figure 25**).

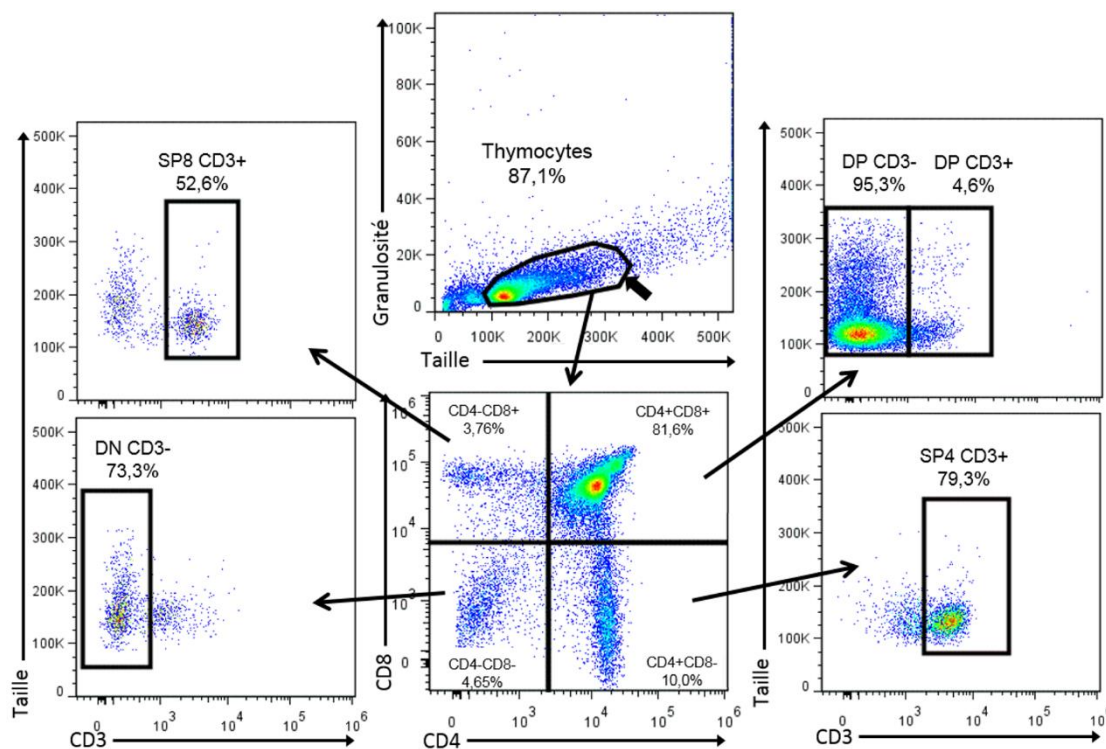


Figure 25 : Exemple d'étude des différents types de thymocytes à partir des tracés de densité obtenus par cytométrie en flux. Les thymocytes ont été isolés à partir des thymus des souris et marqués comme décrit dans la section Matériels et méthodes. Pour chaque souris, les populations de thymocytes ont été déterminées comme présenté ici. L'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel FlowJo. Parmi les thymocytes viables (flèche noire), 4 populations ont été identifiées avec les marqueurs CD4 et CD8. Ensuite, le marqueur CD3 a été utilisé pour préciser cette première sélection.

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les pourcentages des thymocytes totaux malgré une légère diminution chez les souris suspendues (**Figure 26**). Les cellules doubles négatives ($CD4^-CD8^-$) $CD3^-$ ont tendance à augmenter au 13^{ème} jour chez les souris suspendues, mais leur proportion rejoint celle des contrôles au 21^{ème} jour. Concernant les populations doubles positives ($CD4^+CD8^+$), une diminution non significative est observée pour les cellules les moins matures ($DP\ CD3^-$) au 3^{ème} jour chez les souris suspendues, alors que les cellules plus matures $DP\ CD3^+$ ne sont pas modifiées au cours de la suspension. Les populations simples positives $CD8^+CD3^+$, correspondant aux LTc en fin de différenciation, ne sont pas modifiées malgré une légère augmentation aux 3^{ème} et 6^{ème} jours chez les souris suspendues. Les $SP\ CD4^+CD3^+$, correspondant aux LTh en fin de différenciation, ont tendance à augmenter au 3^{ème} jour de la suspension, avant de retrouver les mêmes proportions que chez

les souris contrôles. La suspension a donc peu d'impact sur le développement des lymphocytes T dans le thymus.

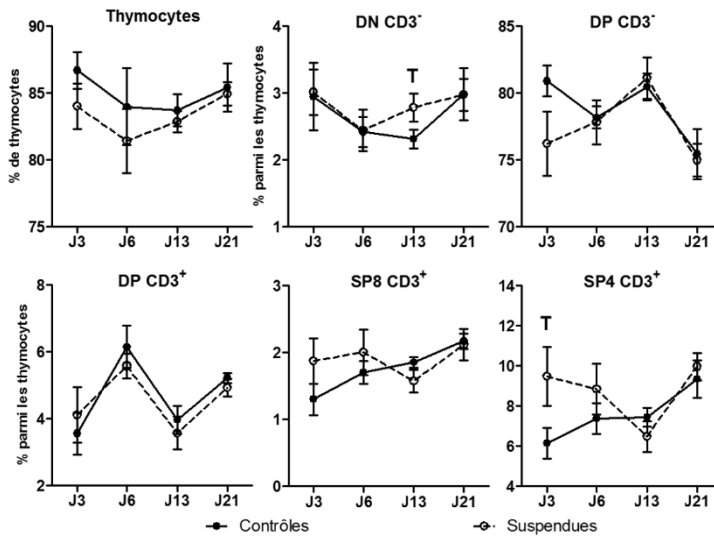


Figure 26 : Évolution des populations de thymocytes durant la suspension. Les sous-populations sont exprimées comme un pourcentage parmi les thymocytes totaux. $n = 6$ souris à chaque point de mesure. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée après un test de Student. $^\dagger p < 0,1$.

DN = $CD4^-CD8^-$ SP8 = $CD4^-CD8^+$
 DP = $CD4^+CD8^-$ SP4 = $CD4^+CD8^+$

IV.6. Populations de lymphocytes B et T dans la rate et réponses lymphoprolifératives

Les sous-populations lymphocytaires de la rate ont été étudiées par cytométrie en flux. Ces sous-populations ont été déterminées au sein des lymphocytes viables comme décrit dans la **figure 15** (page 43). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée pour le nombre de cellules nucléées totales et les pourcentages des sous-populations lymphocytaires de la rate entre les deux groupes de souris à chaque point de mesure (**Figure 27**). Seul, le pourcentage de lymphocytes totaux est significativement diminué au 3^{ème} jour chez les souris suspendues, puis retrouve un pourcentage identique à celui des souris contrôles.

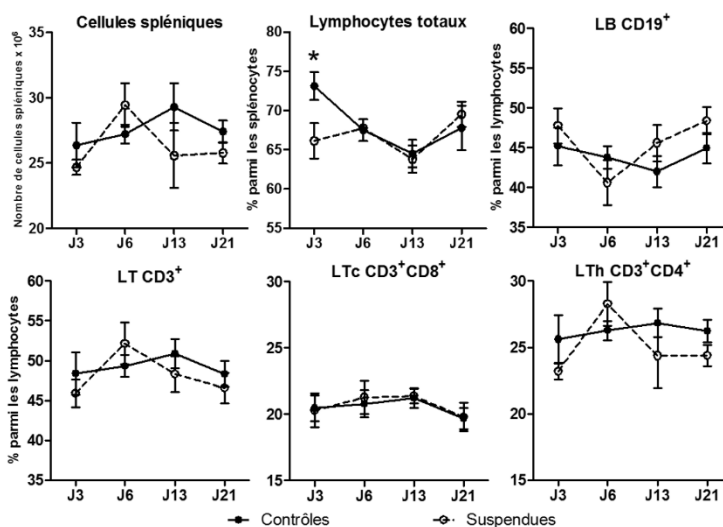


Figure 27 : Évolution du nombre de cellules nucléées et des populations lymphocytaires spléniques durant la suspension. Les sous-populations sont exprimées comme un pourcentage parmi les lymphocytes totaux viables de la rate. $n = 6$ souris à chaque point de mesure. Une différence statistiquement significative a été observée après un test de Student. $* p < 0,05$.

Les splénocytes ont également été analysés par cytométrie en flux, avec un marquage au CFSE, après 72 h de stimulation *in vitro*, avec du LPS ou de la ConA, comme décrit dans les

figures 17 et 18 (pages 44 et 46). Nos résultats montrent que la suspension entraîne une diminution significative de plus de 40% du pourcentage de LB CD19⁺ ayant proliféré dès le 6^{ème} jour de la suspension (**Figure 28A**). Quant aux LT CD3⁺, leur prolifération est diminuée de 48% au 21^{ème} jour de la suspension (**Figure 28B**). Cette diminution s'explique principalement par la réduction de 55% de la réponse des LTc également au 21^{ème} jour (**Figure 28C**), alors que la réponse des LTh n'est pas modifiée (**Figure 28D**).

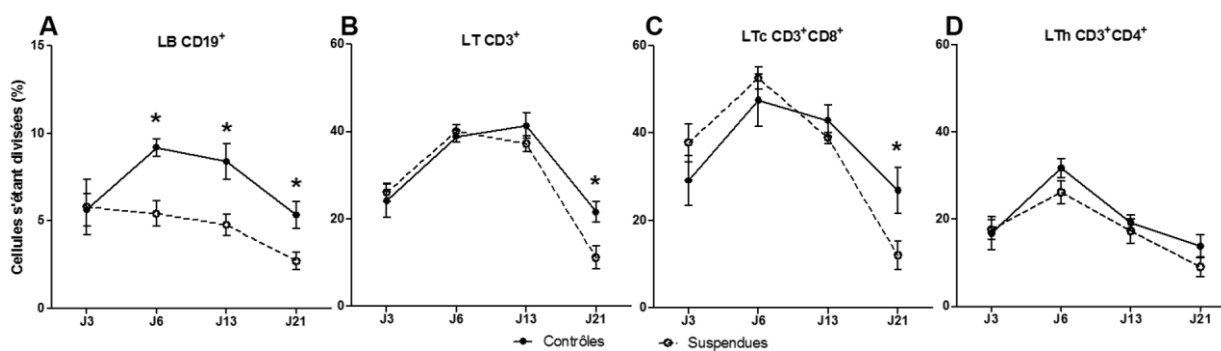


Figure 28 : Évolution du pourcentage de lymphocytes ayant proliféré après 72 h de stimulation mitogénique *in vitro*. (A) Pourcentages de LB CD19⁺ ayant proliféré en réponse au LPS. Pourcentages de (B) LT CD3⁺ (C) LTc CD3⁺CD8⁺ et (D) LTh CD3⁺CD4⁺ ayant proliféré en réponse à la ConA. $n = 6$ souris à J3 et J21 et $n = 3$ souris à J6 et J13. Des différences statistiquement significatives ont été observées après un test de Student. * $p < 0,05$.

Nous n'observons donc pas de changement majeur des populations lymphocytaires dans la rate. En revanche, la suspension a bien un impact plus important sur les LB, en inhibant fortement leur réponse au LPS dès le 6^{ème} jour de la suspension, alors que seuls les LTc voient leur réponse diminuer au 21^{ème} jour.

V. Discussion

Cette étude montre que la suspension anti-orthostatique provoque une fuite des progéniteurs hématopoïétiques vers le sang et une diminution des progéniteurs lymphoïdes précoces (CLP) est observée dès les premiers jours au niveau des membres postérieurs. La modification de l'architecture osseuse observée est très probablement à l'origine de ces modifications. Ces données concordent avec une étude très récente ayant démontré une diminution du nombre de lymphocytes B totaux dans la moelle osseuse de souris suspendues [179].

Le microenvironnement de la moelle osseuse régule la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) *via* des signaux provenant de cellules stromales spécialisées [180]. La suspension ne modifie pas le nombre de CSH. Par contre, les CLP, les cellules pro-B, pré-B et B immatures sont significativement diminués dès le 3^{ème} jour de la

suspension. Or, des études récentes montrent que les CSH et les CLP occupent des niches distinctes au sein de la moelle osseuse [181]. Les progéniteurs précoces des cellules B interagissent avec les progéniteurs d'ostéoblastes et les cellules réticulaires situées à la surface endostéale, tandis que les CSH sont en grande partie dépendantes d'une niche périvasculaire composée de cellules endothéliales et de progéniteurs de cellules mésenchymateuses. Il est donc possible que la suspension affecte plus particulièrement les niches endostéales et ait un effet plus important sur les progéniteurs engagés dans la lignée B. Puisque les progéniteurs de cellules B dépendent de niches distinctes au cours de leur différenciation [182, 183], il serait intéressant à l'avenir d'étudier quelles populations de cellules stromales sont affectées par la suspension. Par ailleurs, une modification de la production de facteurs de croissance et de différenciation, telle que la leptine, dont le rôle majeur dans la lymphopoïèse B a été décrit par Claycombe *et al.* [184], pourrait être mise en évidence. En effet, si sa sécrétion est diminuée au cours de la suspension anti-orthostatique, comme il a été décrit précédemment, cela pourrait expliquer la baisse de la lymphopoïèse B dans nos expériences.

La différenciation des cellules B à partir des CSH dépend de la voie de signalisation de l'IL-7 et d'un ensemble de facteurs de transcription. Nos travaux ont montré que la diminution de la lymphopoïèse B induite par la suspension est associée à une expression réduite d'EBF et PAX5 dans les CLP et d'une moins bonne signalisation induite par l'IL-7 dans les précurseurs de LB. Les facteurs de transcription EBF et PAX5 sont des régulateurs clés de la différenciation des cellules B [4]. EBF joue un rôle crucial dans la spécification de la lignée B puis avec PAX5 dans l'engagement et la différenciation des étapes ultérieures [185–189]. La signalisation *via* le récepteur à l'IL-7 et l'activation de STAT5 ont été démontrés comme favorisant la survie des cellules pro-B et l'expansion des cellules pré-B [190]. La réduction de la signalisation induite par l'IL-7 et de l'expression d'EBF et PAX5 suite à la suspension peuvent donc expliquer la diminution de la lymphopoïèse B. L'ensemble de ces observations pourraient expliquer en partie la diminution de 60% du nombre de LB spléniques observée précédemment chez des souris de 3 mois exposées à 21 jours de suspension [174], bien que curieusement cette diminution des LB n'ait pas été retrouvée chez les souris de 5 mois. En outre, comme dans notre précédente étude, nous observons une diminution de la réponse proliférative des LB spléniques de 40% dès le 6^{ème} jour de suspension, alors que la réponse proliférative des LT spléniques totaux n'est diminuée qu'au 21^{ème} jour de suspension. L'activité des LT est donc altérée beaucoup plus tardivement que celle des LB. L'ensemble de ces résultats confirme en partie nos précédentes observations indiquant que les LT sont moins affectés par la suspension anti-orthostatique que les LB en différenciation et matures [174].

Contrairement aux facteurs de transcription de la lignée B, aucune diminution de l'expression de GATA3, un facteur spécifique des cellules T, n'a été observée chez les CLP des souris suspendues suggérant que le potentiel à générer des cellules T pourrait ne pas être diminué. Cette suggestion a été confirmée par le fait que les sous-populations de cellules T sont inchangées dans le thymus des souris suspendues. La lymphopoïèse T serait donc moins sensible aux variations de gravité. De plus, cela explique pourquoi il n'y a pas de modification de la population de LT totaux spléniques au cours de la suspension.

Il a été montré que les signaux du système nerveux sympathique, induits par des conditions de stress, affectent à la fois le renouvellement osseux, la migration et le développement des CSH [191]. De plus, l'exposition chronique à la corticostérone, consécutive à l'activation de l'axe HPA, conduit à une diminution des cellules souches hématopoïétiques multipotentes, des cellules de la lignée B, ainsi que du nombre de cellules progénitrices stromales de la moelle osseuse [191, 192]. Les concentrations sériques de corticostérone analysées au cours de la suspension indiquent que les souris se sont adaptées rapidement à celle-ci. Bien que nous ne puissions pas exclure qu'il n'y ait pas eu une augmentation transitoire de la corticostérone ou des catécholamines durant les deux premiers jours de l'étude, celle-ci ne peut expliquer la baisse persistante de la lymphopoïèse B. D'autres facteurs sont donc à l'origine de ces modifications. Il serait intéressant de déterminer la concentration de la leptine, dont le rôle dans l'homéostasie du tissu osseux comme dans celle de l'hématopoïèse a été déjà suggéré [154, 193, 194].

Comme nous l'avons déjà observé dans nos expériences comme dans celles d'autres équipes, les souris suspendues ont une masse corporelle plus faible que les contrôles à la fin des 21 jours [136, 171, 174]. Les apports et dépenses énergétiques, malgré la disponibilité de nourriture en quantité suffisante, sont une explication possible de cette observation. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, il a été montré que la dépense énergétique est significativement augmentée chez les rats et les souris suspendus [149, 195]. De même, les astronautes brûlent plus de calories qu'ils n'en consomment, ce qui entraîne un bilan énergétique négatif [196, 197].

Il a été démontré que les vols spatiaux induisent un remodelage osseux avec une diminution des ostéoblastes [81] comme chez les individus âgés. Ainsi, la diminution de la lymphopoïèse B induite par la suspension est comparable à celle observée chez des souris âgées de 18 à 22 mois (*Publication n°2*). Il a été montré une diminution de la différenciation des cellules B à partir du stade CLP et une diminution plus prononcée au niveau des cellules pré B chez les souris âgées comme chez des souris suspendues (*Publication n°2*). En revanche,

l'augmentation des CSH avec l'âge n'est pas reproduite lors de la suspension. Il y a également une diminution substantielle, à la fois du volume de l'os trabéculaire et du nombre de travées chez les souris âgées, qui est similaire à celle observée après 21 jours de suspension. Cependant, les travées de souris âgées étaient plus épaisses et plus dispersées que chez les souris suspendues. Ces résultats indiquent que les changements induits par la suspension dans la structure de l'os trabéculaire sont similaires, mais moins prononcés, que ceux qui se produisent avec l'âge. Ces observations sont en faveur d'une baisse de la concentration de la leptine pendant la suspension, qui stimulerait moins la production des ostéoblastes [196].

Dans cette étude, nous montrons pour la première fois que la suspension conduit à une diminution de la lymphopoïèse B dès les progéniteurs précoces engagés dans la voie lymphoïde, comme chez des souris âgées. La suspension anti-orthostatique pourrait donc être un modèle intéressant pour améliorer notre compréhension de la relation entre le remodelage osseux et la lymphopoïèse B. A l'avenir, il serait intéressant de déterminer si la diminution de la lymphopoïèse B induite par la suspension est réversible, comme cela a été suggéré pour la structure osseuse [198]. De plus, ce modèle pourrait aider au développement de contre-mesures pour améliorer la production et l'activation des lymphocytes des astronautes, mais aussi des personnes alitées ou âgées.

**CHAPITRE 3 : LES EFFETS DE
L'HYPERGRAVITE SUR LA REponse DES
LYMPHOCYTES B DE LA RATE**

Les effets de l'hypergravité sur les lymphocytes B après stimulation au LPS

I. Introduction

Nous avons vu précédemment que les vols spatiaux représentaient un modèle de stress multifactoriel particulier, incluant non seulement des stress sociaux, mais aussi environnementaux tels que les radiations, la perturbation du rythme circadien, mais surtout des modifications de la gravité [172, 199]. La micropesanteur ainsi que l'hypergravité ressentie au décollage et à l'atterrissage peuvent avoir de lourdes conséquences sur l'organisme.

Dans le chapitre précédent nous avons montré que la suspension anti-orthostatique entraînait d'importantes modifications au niveau des lymphocytes [174]. En effet, la lymphopoïèse B, la proportion des lymphocytes B matures dans la rate, de même que leur réponse au mitogène LPS sont fortement perturbées chez les souris exposées à la micropesanteur simulée. Les lymphocytes T sont également impactés, mais dans une moindre mesure.

Plusieurs travaux ont été menés avec des modèles d'hypergravité [200–202]. Même si celle-ci est physiquement opposée à la micropesanteur, ce modèle permet de reproduire plusieurs facteurs de stress chroniques inhérents aux vols spatiaux, comme l'exposition à un nouvel environnement, les changements dans les charges des membres et les modifications de distribution des fluides corporels [133]. Le modèle d'hypergravité consiste à reproduire l'augmentation de la gravité ressentie par les astronautes. Pour ce faire, des rongeurs sont placés dans des nacelles adaptées fixées aux bouts des bras d'une centrifugeuse à large rayon. La vitesse de rotation va permettre d'induire l'hypergravité [200–202].

Les expériences de centrifugation chronique menées avec des rats ont montré une forte activation du système nerveux sympathique (SNS) et de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA) dans les premiers jours. Le SNS ne semble activé qu'à partir de 4G [203], alors qu'une augmentation de la corticostérone sérique a été observée dès le début d'une centrifugation à 3G [204]. Par ailleurs, plusieurs auteurs [205, 206] ont démontré que l'exposition chronique à l'hypergravité peut affecter les réponses émotionnelles et l'anxiété ainsi que l'apprentissage spatial, mais certains de ces changements de comportement sont souvent réversibles après un retour en normopesanteur [207]. L'étude immunologique menée par Pecaut *et al.* [202] sur des souris centrifugées à 2G ou 3G pendant 21 jours a permis de mettre en évidence des

changements dans la réponse lymphoproliférative spontanée ou induite par des mitogènes et la capacité des splénocytes à sécréter des cytokines *in vitro*.

Afin de compléter ces observations et de déterminer l'importance de la modification de la gravité sur le système immunitaire, plusieurs expériences de centrifugation à différentes vitesses ont été réalisées sur des souris par l'équipe. Elles ont montré que les animaux s'adaptaient à une gravité de 2G après 3 semaines, alors qu'à partir de 3G, un état de stress persistait plus de 2 semaines après le retour en normopesanteur [126]. L'hypergravité induit également une diminution de la réponse proliférative des splénocytes au LPS de 40% associée à une plus faible expression des cytokines Th1, comme chez les astronautes et les personnes soumises à des stress chroniques sur Terre [208, 209]. De plus, les expériences de centrifugation réalisées par l'équipe ont montré que la prolifération des lymphocytes T était diminuée à 2G et 3G (environ 20%), mais moins fortement que celle des lymphocytes B par rapport aux souris contrôles [126]. Ces données ont démontré qu'une augmentation de la gravité avec (3G) ou sans (2G) stress physiologique agit sur le système immunitaire humoral.

L'hypergravité, comme la micropesanteur simulée, affecte donc de la même façon les cellules du système immunitaire spécifique. Ce sont surtout les lymphocytes B, essentiels au développement de la réponse humorale et à la production d'anticorps, qui sont sensibles aux modifications de gravité.

La stimulation des lymphocytes B par le LPS va activer les voies du TLR-4 et engendrer une cascade de signalisation (**Figure 29**). D'une part, la voie MyD88-dépendante, impliquant MyD88 et Tirap, va initier l'activation de deux autres modules de transduction du signal ; la voie MAPK (Mitogen activated protein kinase) et la voie IKK (I κ B kinase). La voie MAPK, constituée de gènes activés après phosphorylation (JNK, p38 et Erk) permet la phosphorylation puis la transcription du facteur AP-1. La voie IKK implique la phosphorylation du facteur de transcription NF κ B qui va alors migrer dans le noyau. Ainsi, cette voie MyD88-dépendante induit la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL1 β , l'IL-6, l'IL-12 et le TNF α et aussi de molécules d'adhésion [8, 9]. La voie MyD88-indépendante implique les molécules adaptatrices TRIF et TRAM et conduit à la transcription de molécules de co-stimulation qui vont induire l'expression d'interférons de type I par une combinaison de l'expression de NF κ B et IRF3 [9].

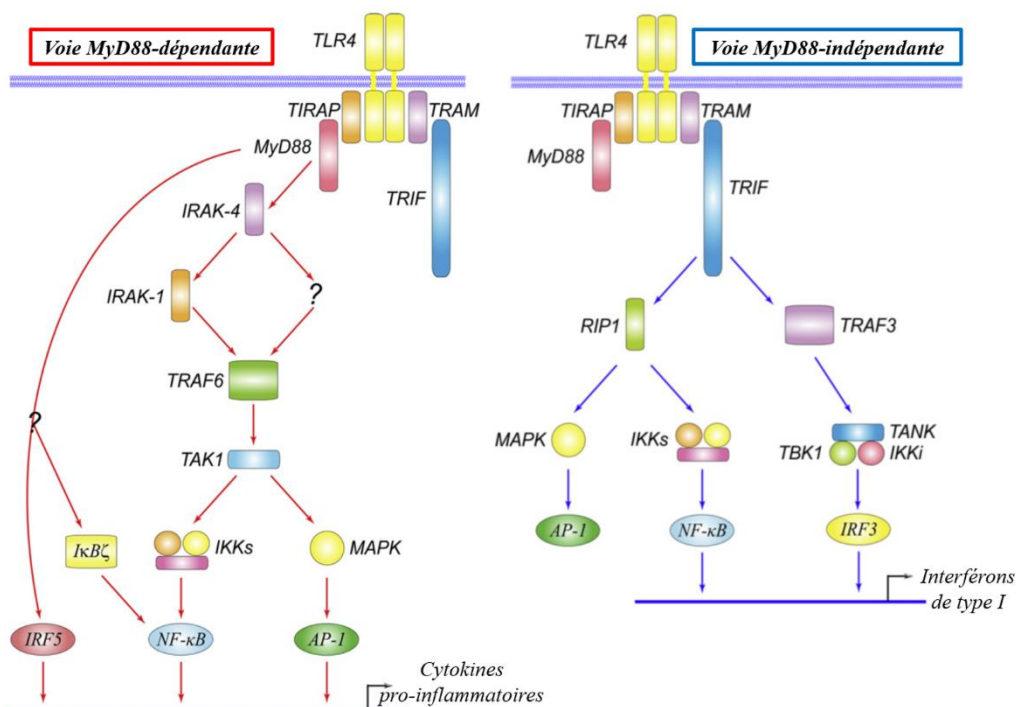


Figure 29 : Voies MyD88-dépendante et MyD88-indépendante du TLR-4. La reconnaissance du LPS par son récepteur, le TLR-4, entraîne l'activation du signal qui va suivre une des deux voies présentées ici. La voie MyD88-dépendante conduit à une activation de TRAF6 par MyD88 pour aboutir à l'activation en aval des facteurs de transcription NFκB, AP-1 et IRF5, ce qui induit l'expression des gènes de cytokines pro-inflammatoires. La voie MyD88-indépendante entraîne l'induction d'interférons de type I par Trif en recrutant Traf3 et RIP1 pour activer IRF3, tout comme NFκB et AP-1. (D'après Lu *et al.* [9])

II. Objectifs de l'étude

Afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires pouvant expliquer la diminution de la réponse des lymphocytes B au LPS après centrifugation à 2G, nous avons entrepris d'étudier leur transcriptome. Pour cela, une centrifugation de souris à 2G a été réalisée durant 21 jours et les lymphocytes B ont été purifiés avant ou après stimulation spécifique au LPS.

L'étude transcriptomique des différents échantillons de LB purifiés a été réalisée par puces à ADN par une société de service, CiToxLAB. Les résultats ont permis de mettre en évidence des modifications de l'expression de nombreux gènes dans les LB des souris centrifugées à 2G par rapport aux souris contrôles maintenues à 1G.

L'objectif de ce travail a été de vérifier les niveaux de transcription des gènes impliqués dans les voies de signalisation du TLR-4, le récepteur au LPS des LB, par PCR quantitative. Pour cela, les principaux gènes impliqués dans cette voie ont été sélectionnés à partir des résultats de l'étude transcriptomique, et pour compléter ces résultats des gènes supplémentaires impliqués dans les voies MyD88-dépendante et -indépendante ont été choisis.

III. Matériels et méthodes

III.1. Centrifugation à 2G

Les expérimentations ont été réalisées avec des souris mâles C57Bl/6J (Laboratoires Charles River) âgées de 8 à 9 semaines. Les souris ont d'abord été acclimatées pendant une semaine en groupe de 4 par cage standard, avec de l'eau et de la nourriture à volonté, dans une pièce calme avec une température constante (22°C), 50% d'humidité relative et un cycle jour/nuit de 12 h : 12 h.

Notre procédure a été basée sur les expérimentations réalisées précédemment [126]. Les animaux ont été séparés de façon aléatoire et répartis en deux groupes de 16 souris pour les souris contrôles (1G) et centrifugées (2G). Les cages, avec suffisamment de nourriture et d'eau pour 3 semaines, ont été placées dans les nacelles d'une centrifugeuse à grand rayon avec une vitesse de rotation produisant un vecteur de gravité de 2G (**Figure 30**). La centrifugation à 2G a été réalisée sur une durée continue de 21 jours. Les cages contenant les souris 1G ont été placées dans les mêmes nacelles et dans la même pièce que les souris 2G, mais en position statique, avec suffisamment d'eau et de nourriture pour 3 semaines.



Figure 30 : Photographie de la centrifugeuse à grand rayon utilisée pour réaliser les expérimentations à 2G.

Les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec la Législation Nationale (Décret n°2013-11) et la Directive Européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63/UE). Ce protocole a été approuvé par le Comité Régional d'Éthique pour l'Expérimentation Animale de la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur.

III.2. Suivi des animaux et recueil des échantillons biologiques

Les cages des souris 2G n'ont pas été changées pendant trois semaines, tout comme les cages des souris 1G. Tout au long des 21 jours d'expérimentation, chaque nacelle a été filmée de jour comme de nuit par infrarouge, afin d'observer le bon déroulement de l'expérience. A l'arrêt de la centrifugation, les animaux ont été mis à mort par décapitation entre 8h00 et 10h00. Le sang a été récolté et laissé coaguler à température ambiante pendant 15 min, puis le sérum a

été recueilli par centrifugation et conservé à -80°C. La rate de chaque animal a été prélevée et pesée puis placée immédiatement dans un tube stérile contenant 3 mL de milieu RPMI 1640.

III.3. Tri des splénocytes avant ou après stimulation au LPS

Après dissociation de la rate et lyse des globules rouges, les splénocytes ont été partagés en deux lots de 50×10^6 cellules spléniques chacun. Les LB ont été isolées du premier lot (échantillons J0) par sélection négative grâce au kit CD43 (Ly-48) MicroBeads mouse (Miltenyi Biotec). Le second lot de cellules a été mis en culture pendant 48 h à une densité de 5×10^6 cellules/mL de milieu de culture supplémenté avec $5 \mu\text{g/mL}$ de LPS d'*E. coli* dans des flasques de 25 cm^2 . Puis les LB ont également été isolés avec le kit CD43 (Ly-48) MicroBeads (échantillons J2). Les cellules spléniques de 3 ou 4 souris ont été mélangées avant de réaliser le tri. Les LB et les autres splénocytes issus du tri ont été conservés à -80°C.

III.4. Analyses transcriptomiques des lymphocytes B de la rate

III.4.1. Extraction des ARN

A partir des lymphocytes B conservés à -80°C, les ARN totaux ont été extraits selon le protocole du RNeasy Mini Kit de Qiagen. L'ARN total a été quantifié par spectrophotométrie UV. L'absorbance a été mesurée à 260, 230 et 280 nm pour déterminer la concentration et la pureté des échantillons. Le rapport A260/A280 doit être proche de 2,0 pour s'assurer de l'absence de protéine et le rapport A260/A230 doit être compris entre 2,0 et 2,2 pour s'assurer de l'absence de solvant organique. Le contrôle de la qualité de l'ARN a été effectué en utilisant une électrophorèse micro-capillaire sur un bioanalyseur Agilent 2100. Le Numéro d'Intégrité de l'ARN (RIN pour RNA Integrity Number) a été déterminé pour chaque échantillon. Un RIN de 4 à 10 a été considéré comme acceptable. Les ARN ont été aliquotés et conservés à -80°C.

III.4.2. Transcription inverse

La préparation des ADNc pour les puces à ADN a été effectuée avec 50 ng d'ARN selon le protocole du système NuGEN Ovation[®] d'amplification d'ARN (NuGEN Technologies Inc.) par le prestataire CiToxLAB.

Au laboratoire, la préparation des ADNc pour la quantification par PCR en temps réel a été effectuée à partir de $2 \mu\text{g}$ d'ARN selon le protocole suivant. La transcription inverse des ARN a été réalisée dans des tubes avec deux mélanges de réactifs. Le premier mélange réactionnel était composé de 10 mM de dNTP (Invitrogen), de $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ d'amorces aléatoires (Invitrogen) et d'eau ultra pure qsp $12 \mu\text{L}$ auxquels ont été ajoutés 400 ng d'ARN. Ces tubes ont été placés dans un thermocycler (MasterCycler Eppendorf) pendant 5 min à 65°C puis 2 min

à 4°C. Un deuxième mélange réactionnel a été préparé afin de réaliser la synthèse de l'ADNc avec la transcriptase inverse M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Ce second mélange était composé du tampon pour la M-MLV à une concentration de 1X, de 0,1 M de DTT, de 20 U/μL de RNase Out et 100 U/μL de M-MLV (Invitrogen). Le second mélange a été incubé à température ambiante pendant 7 min avant d'être ajouté aux tubes contenant le premier mélange. Les tubes ont ensuite été incubés dans un thermocycler selon le programme suivant : 10 min à 25°C, 50 min à 37°C, 5 min à 70°C et 4°C après la fin du programme. Les ADNc obtenus ont été conservés -20°C.

III.4.3. Puces à ADN

Après la synthèse d'ADNc par le système NuGEN Ovation[®], 4 μg d'ADNc biotinylés ont été hybridés pendant 18 h à 45°C sur des puces Affymetrix GeneChip[®] ayant l'identifiant Mouse 230_2. Ensuite les puces ont été lavées, révélées et numérisées avec un scanner GeneArray et les données ont été traitées avec le logiciel Affymetrix GeneChip[®] Command Console (AGCC). Les images numérisées ont été converties en valeurs numériques de l'intensité du signal (Signal) et en mesures du niveau d'expression catégorique (Absolute Call) en utilisant l'algorithme Affymetrix MAS 5.0 pour l'ensemble des puces génomiques. Les images de contrôle qualité ont été réalisées par inspection visuelle. Les mesures de puces de contrôle qualité ont été effectuées selon le SOP GEN 0351.

III.4.4. PCR quantitative en temps réel

Les ADNc d'intérêt ont été quantifiés par PCR quantitative en temps réel, ou qPCR, par rapport aux ADNc de quatre gènes de référence en utilisant un mastercycler Realplex² (Eppendorf). Le mélange réactionnel était composé de Master Mix MESA FAST 2X contenant la sonde SYBR[®] Green (Eurogentec), 7,5 nM d'oligonucléotides sens et anti-sens et de l'eau ultra pure pour un volume final de 15 μL. Pour chaque échantillon, 1,5 μL de la solution d'ADNc ont été ajoutés au mélange réactionnel. Pour réaliser une calibration de chaque analyse, de l'ADNc de splénocytes de plusieurs souris contrôles a été dilué 4 fois au 1/10^{ème} ou au 1/5^{ème} dans de l'eau ultra pure avant d'être ajouté au mélange réactionnel. Le programme était composé d'un cycle à 95°C pendant 5 min puis de 40 cycles comprenant 15 sec à 95°C et 45 sec à la température d'hybridation spécifique pour chaque couple d'oligonucléotides. Ensuite, une courbe de fusion a été réalisée afin de s'assurer de la qualité de l'amplification. Chaque amplification a été réalisée deux fois en duplicat.

Une droite a été établie à partir de la moyenne des cycles seuils (Ct) obtenus avec les mélanges d'ADNc contrôles et du log de la dilution correspondante afin de déterminer

l'efficacité des PCR en utilisant la formule : $\text{Efficacité} = 10^{(-1/\text{pente})}$. Le pourcentage d'efficacité a ensuite été obtenu grâce à la formule : $[(\text{efficacité}-1)*100]$. Un pourcentage d'efficacité compris entre 85% et 110% a été considéré comme acceptable.

A partir de l'efficacité de PCR de chaque ADNc, la quantité amplifiée a été calculée selon la formule : $[\text{efficacité}^{(\text{moyenne Ct minimale} - \text{moyenne Ct échantillon})}]$. Cette quantité a été déterminée pour chaque échantillon et chaque ADNc. Une moyenne géométrique a été calculée pour un même échantillon à partir des quantités des ADNc de référence. Cette moyenne géométrique a été utilisée pour normaliser l'expression des ADNc d'intérêt pour chaque échantillon avec le rapport : $[\text{quantité de l'ADNc d'intérêt} / \text{moyenne géométrique des ADNc de référence}]$. A partir des quantités rapportées aux ADNc de référence, une expression relative a été calculée avec comme référence la moyenne des quantités déterminées pour les échantillons témoins. Pour cela, la formule suivante a été appliquée : $[\text{normalisation d'un lot} / \text{moyenne des normalisations du groupe témoin}]$. La moyenne des témoins a donc une expression de 1 et les autres ont donc une quantité augmentée ou diminuée par rapport aux témoins.

Quatre couples d'oligonucléotides ont été définis au laboratoire afin d'amplifier les ADNc des gènes de référence (**Tableau 4**) et leur stabilité a été validée avec le logiciel BestKeeper. Pour cette étude, les quatre ADNc des gènes de référence ont été retenus : Eef2, Ppia, Rpl13 et Eif3f.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence de l'oligonucléotide (5'-3')	Température d'hybridation
Eef2 Sens	GTGGTGGACTGTGTGTCTGG	58 °C
Eef2 Anti-sens	CGCTGGAAGGTCTGGTAGAG	
Ppia Sens	GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC	58 °C
Ppia Anti-sens	GCGTGTAAGTCAACCACCT	
Rpl13 Sens	GGAAGCGGATGAATACCAAC	61 °C
Rpl13 Anti-sens	CTTGTCATAGGGTGGAGGGA	
Eif3f Sens	CATCAAGGCCTATGTCAGCA	61 °C
Eif3f Anti-sens	GTGGTGGACTGTGTGTCTGG	

Tableau 4 : Séquences des oligonucléotides utilisées pour amplifier les ADNc des gènes de référence.

Les oligonucléotides permettant d'amplifier les ADNc des gènes impliqués dans la voie TLR-4, et dont l'expression apparaît modifiée à partir des résultats des puces à ADN, ont été déterminés grâce aux outils bio-informatiques NCBI et Blast. Les oligonucléotides ont été commandés chez Eurogentec en qualité standard pour PCR. Les séquences de ces couples d'oligonucléotides sont listées dans le **tableau 5**.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence de l'oligonucléotide (5'- 3')	Température d'hybridation
Fos Sens	TTTCAACGCCGACTACGAGG	61 °C
Fos Anti-sens	GCGCAAAGTCCTGTGTGTT	
Irak4 Sens	CCGGCGACGACAGATAACAAT	64 °C
Irak4 Anti-sens	CAACTGTGCAGTTCGTGGTG	
JNK Sens	CCAGCTGACTCAGAGCATAA	60 °C
JNK Anti-sens	GACGTTGATGTATGGGTGCT	
Map3k7ip2 Sens	AAGCCCGAGGACCACATTTT	60 °C
Map3k7ip2 Anti-sens	CCTCTGCGTCTTGGGTCTTT	
MyD88 Sens	GCTGCTGGCCTTGTTAGACC	62 °C
MyD88 Anti-sens	AGGCTTCTCGGACTCCTGGT	
p38 Sens	TTGGTCCGTTGGCTGCATCA	60 °C
p38 Anti-sens	CTCTGCACTCTGTAGCTTCT	
RIP1 Sens	GGCCAACATTTCTTGGCATTG	62 °C
RIP1 Anti-sens	ACATTCTCTGCAGCACTGGG	
Tirap Sens	CGAGTCCTACCAAGCCACTT	62 °C
Tirap Anti-sens	GCCGATTCCAGGTAGATTGC	
Traf6 Sens	TTCCCTGACGGTAAAGTGCC	62 °C
Traf6 Anti-sens	ACGTTGGCACTGGGGACAAT	
Tram Sens	GAAGATCGAAGAGCCTCGTG	61 °C
Tram Anti-sens	AGACGCCTTAGCCTCCAGTG	
Trif Sens	TACAGCCAGGTCTGTGCTGC	64 °C
Trif Anti-sens	GAATGCCAAAGGCACCACGG	

Tableau 5 : Séquences des oligonucléotides utilisées pour quantifier les ADNc codant des protéines de la voie TLR-4 des LB spléniques avant ou après stimulation *in vitro* au LPS.

III.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS v13.0 (SPSS Inc.). La normalité et l'homogénéité des variances ont été évaluées grâce aux tests de Kolmogorov-Smirnov et Levene. Lorsque les valeurs suivaient une loi normale, les comparaisons des résultats entre les groupes de souris ont été effectuées avec un test de Student. Quand les données n'étaient pas distribuées selon une loi normale, les comparaisons ont été effectuées avec un test de Mann-Whitney. Pour indiquer la tendance et la significativité, les valeurs de $p < 0,10$ et $< 0,05$ ont été respectivement sélectionnées. Toutes les données ont été présentées sous forme de moyennes avec l'erreur standard à la moyenne (ESM).

IV. Résultats

IV.1. Résultats de l'étude transcriptomique

En regroupant les souris pour optimiser le tri cellulaire, 4 lots de LB de souris 2G et 4 lots de LB de souris 1G ont été obtenus. Après extraction des ARN totaux, seuls 3 lots sur 4 ont été conservés, en fonction de leur qualité, pour les hybridations avec les 39 000 sondes des puces

à ADN. L'analyse par puces à ADN a permis de mettre en évidence entre 500 et 3500 gènes dont les quantités de transcrits augmentent ou diminuent en fonction de la comparaison étudiée. Suite à ce premier criblage les voies de signalisation des récepteurs BCR et TLR-4 des lymphocytes B ont été étudiées. Ici, nous ne traiterons que de la voie TLR-4, le récepteur du LPS.

Les études transcriptomiques ont été réalisées de sorte à effectuer 4 comparaisons permettant de mettre en évidence les effets de différents facteurs :

- i) l'effet de l'hypergravité,
- ii) l'effet de la stimulation au LPS à 1G,
- iii) l'effet de la stimulation au LPS à 2G,
- iv) l'effet de l'hypergravité sur la stimulation au LPS.

Après 21 jours d'hypergravité, l'expression du gène p38 est augmentée suite à 21 jours d'hypergravité (**Figure 31**). Après stimulation au LPS, l'expression de Map3k7ip2 relié à Erk est diminuée à 1G, tandis que les expressions de Tirap, Irak4, RIP1 et JNK sont diminuées à 2G. Enfin, la réponse à la stimulation au LPS après exposition à l'hypergravité entraîne une expression augmentée de Fos reliée à AP-1. Selon l'étude transcriptomique, plus de transcrits de la voie MyD88-dépendante sont affectées par l'hypergravité.

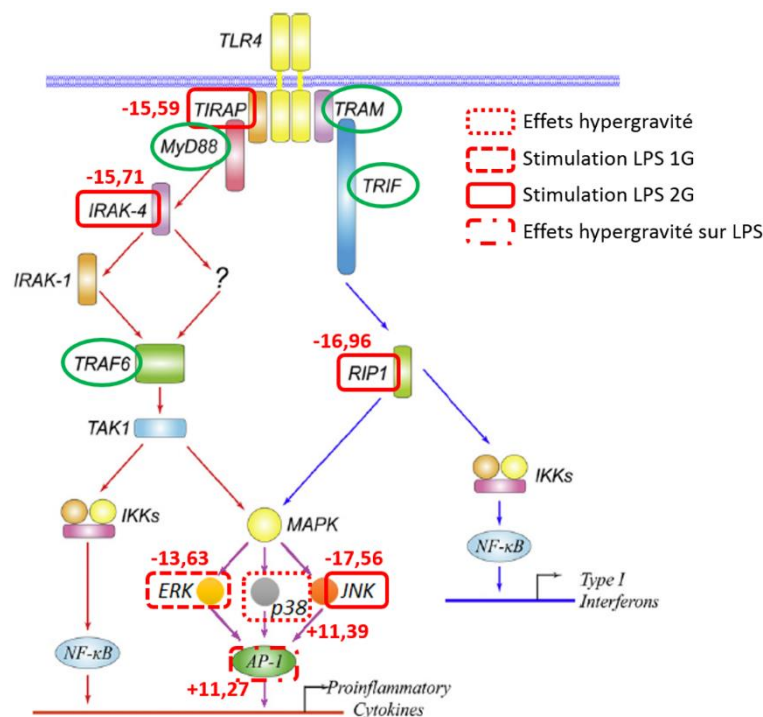


Figure 31 : Schéma des résultats de l'étude de la voie TLR-4 par puces à ADN. L'expression des gènes de la voie TLR-4 a été analysée par puces à ADN à partir des LB triés après la mise à mort des souris contrôles et centrifugées ou après 48 h de stimulation au LPS. Les gènes de la voie MyD88-dépendante (flèches rouges), MyD88-indépendante (flèches bleues) et communs aux deux voies (flèches violettes) qui sont modifiés selon la comparaison réalisées sont indiqués par les rectangles rouges. Les gènes qui sont ajoutés pour l'étude par qPCR sont indiqués par les cercles verts. $n = 3$ lots de 3 ou 4 souris.

Afin de confirmer ces résultats, des PCR quantitatives ont été réalisées en ajoutant l'étude des gènes MyD88 et Traf6 pour la voie MyD88-dépendante et Tram et Trif pour la voie MyD88-indépendante pour compléter les analyses (**Figure 31**). Ces analyses ont permis de révéler plusieurs modifications de l'expression des gènes impliqués dans la voie TLR-4.

IV.2. Effets de l'hypergravité sur la voie TLR-4 des lymphocytes B

Les effets de l'hypergravité sont observés par comparaison des LB isolés après 21 jours d'exposition des souris à 2G (2G J0) avec ceux isolés des souris contrôles (1G J0). Une modification de l'expression des gènes appartenant à la voie MyD88-dépendante est observée (**Figure 32A**). Les quantités d'ARNm de Tirap, Irak4 et Traf6 sont significativement augmentées de 63%, 67% et 39%, respectivement. MyD88, couplé à Tirap, n'est pas modifié par l'hypergravité. En ce qui concerne la voie MyD88-indépendante, l'expression des gènes Tram, Trif et RIP1 n'est pas modifiée de façon significative (**Figure 32B**). Ces deux voies aboutissent à des gènes communs comme Map3k7ip2, relié à Erk, dont l'expression n'est pas modifiée (**Figure 32C**). L'étude transcriptomique avait permis de déterminer une augmentation de p38 (**Figure 31**) qui est confirmée ici par l'augmentation significative de 62%. La quantité de transcrits de JNK a tendance à augmenter de 38% chez les souris centrifugées (**Figure 32C**). Ces quatre gènes aboutissent à l'induction du gène Fos, relié à AP-1, dont l'expression n'est pas modifiée.

En résumé, l'hypergravité entraîne l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie MyD88-dépendante du TLR-4.

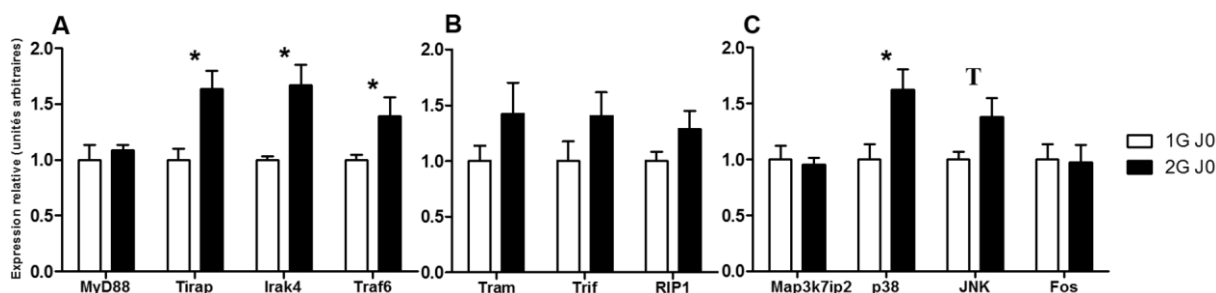


Figure 32 : Effets de l'hypergravité sur l'expression des gènes de la voie TLR-4. L'expression des gènes sélectionnés a été quantifiée par qPCR à partir des LB triés après la mise à mort (J0) des souris contrôles (1G) et centrifugées (2G). (A) Gènes de la voie Myd88-dépendante. (B) Gènes de la voie MyD88-indépendante. (C) Gènes communs aux deux voies. $n = 4$ lots de 3 ou 4 souris. Des différences significatives ont été observées après un test de Student (Tirap, p38 et JNK) ou de Mann-Whitney (Irak4 et Traf6). $^{\dagger} p < 0,1$; $* p < 0,05$.

IV.3. Effets de la stimulation au LPS sur la voie TLR-4 des LB à 1G ou à 2G

Pour étudier les effets de la stimulation des LB au LPS sur la voie TLR-4, l'expression des gènes dans les LB triés avant stimulation (J0) est comparée à celle dans les LB triés après

48 h de stimulation *in vitro* (J2) pour chaque lot de souris, le lot contrôle (1G) et le lot hypergravité (2G).

L'étude de la réponse au LPS des LB des souris 2G est comparée à celle des LB des souris 1G. En étudiant la voie MyD88-dépendante, l'expression du couple MyD88-Tirap après stimulation n'est pas différente de celle avant stimulation à 1G (**Figure 33A**). Les résultats de l'étude transcriptomique sont confirmés pour Tirap après stimulation à 2G (**Figure 31**), car la diminution de 45% observée est significative (**Figure 33A**). L'expression des gènes Irak4 et Traf6 est significativement diminuée après stimulation au LPS, avec une diminution plus importante de 10% à 2G par rapport à 1G. Cette diminution de 40% d'Irak4 après stimulation à 2G confirme les données obtenues avec les puces à ADN (**Figure 31**). Les expressions des gènes impliqués dans la voie MyD88-indépendante ne sont pas modifiées après stimulation au LPS à 2G, alors que l'expression de Tram est significativement augmentée de 72% chez les souris 1G (**Figure 33B**). A noter que la diminution de l'expression de RIP1 observée avec les puces à ADN n'est pas retrouvée ici (**Figure 31**). Les diminutions de l'expression des gènes communs aux deux voies sont similaires à 1G et 2G (**Figure 33C**). En effet, Map3k7ip2 est significativement diminué de 50%. Cette diminution de l'expression à 1G et 2G concorde avec celle observée avec l'étude transcriptomique (**Figure 31**). La quantité de transcrits de p38 est significativement diminuée dans les deux groupes de souris après stimulation au LPS (**Figure 33**). De même, l'expression de JNK est significativement divisée par 2 après stimulation et cela

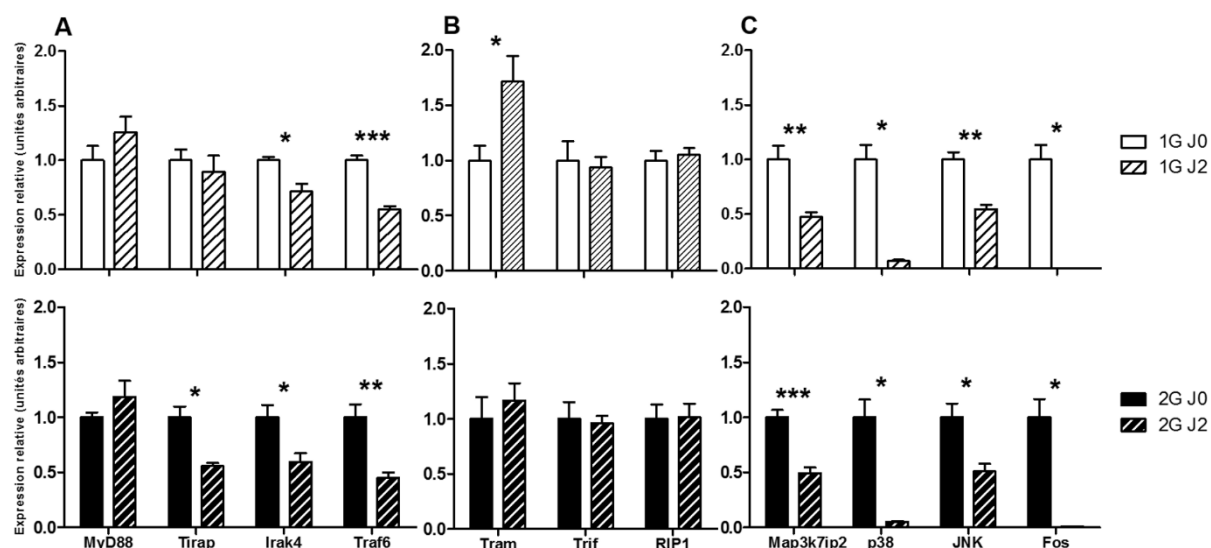


Figure 33 : Effets de la stimulation au LPS sur la voie TLR-4 à 1G ou à 2G. L'expression des gènes sélectionnés a été quantifiée par qPCR à partir des LB triés après la mise à mort (J0) des souris contrôles (1G) et centrifugées (2G) ou après 48 h de stimulation au LPS (J2) des splénocytes des souris 1G et 2G. (A) Gènes de la voie MyD88-dépendante. (B) Gènes de la voie MyD88-indépendante. (C) Gènes communs aux deux voies. $n = 4$ lots de 3 ou 4 souris. Des différences significatives ont été observées après un test de Student (Tirap, Irak4, Traf6, Map3k7ip2 et JNK) ou de Mann-Whitney (p38 et Fos). $^{\dagger} p < 0,1$; $* p < 0,05$; $** p < 0,005$; $*** p < 0,001$.

correspond aux résultats des puces à ADN à 2G (**Figure 31**). La quantité de transcrits de Fos, relié à AP-1, est également significativement diminuée après stimulation au LPS dans les deux groupes (**Figure 33C**). La stimulation au LPS induit donc une diminution de l'expression de la plupart des gènes de la voie MyD88-dépendante et ne modifie pas la voie MyD88-indépendante, excepté pour Tram qui augmente. Lorsque la stimulation est réalisée sur les cellules des souris 2G, les observations sont semblables à celles obtenues à 1G, seul Tram n'est pas augmenté après stimulation au LPS à 2G.

IV.4. Effets de l'hypergravité sur la réponse au LPS

Les effets de l'hypergravité sur la réponse au LPS sont mis en évidence en comparant l'expression des gènes dans les LB triés après 48 h de stimulation des splénocytes des souris contrôles (1G J2) à celle des LB des souris centrifugées (2G J2). L'expression des gènes de la voie MyD88-dépendante du TLR-4 n'est pas modifiée dans les LB des souris centrifugées (**Figure 34A**). Quant à la voie MyD88-indépendante, l'expression de Trif augmente significativement de 45% chez les souris 2G, tandis que l'expression de Tram et RIP1 n'est pas modifiée (**Figure 34B**). Les transcrits des gènes communs aux deux voies, Map3k7ip2, p38 et JNK ne sont pas impactés par l'hypergravité après une stimulation au LPS (**Figure 34C**). En revanche, l'étude transcriptomique avait mis en évidence une augmentation de l'expression de Fos (**Figure 31**) qui n'est pas confirmée ici. Après une stimulation au LPS, l'hypergravité induit donc une augmentation de l'expression d'un gène impliqué dans la voie MyD88-indépendante du TLR-4.

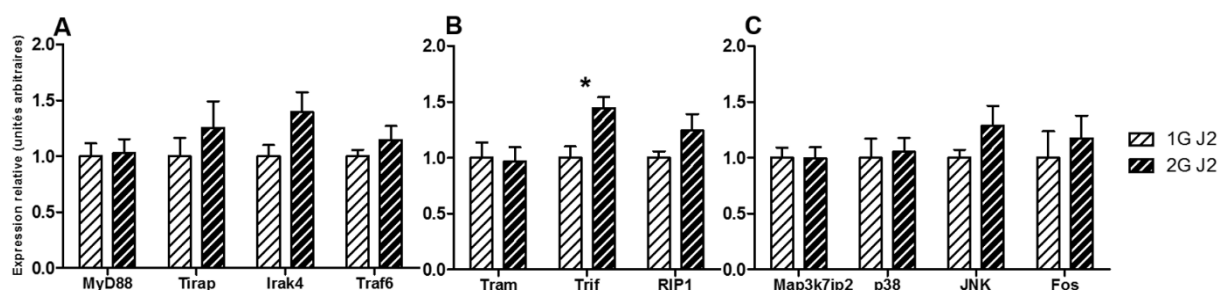


Figure 34 : Effets de l'hypergravité sur la réponse au LPS. L'expression des gènes sélectionnés a été quantifiée par qPCR à partir des LB triés après 48 h de stimulation au LPS (J2) de splénocytes des souris contrôles (1G) et centrifugées (2G). (A) Gènes de la voie MyD88-dépendante. (B) Gènes de la voie MyD88-indépendante. (C) Gènes communs aux deux voies. $n = 4$ lots de 3 ou 4 souris. Une différence significative a été observée après un test de Student. * $p < 0,05$.

V. Discussion

Cette étude met en évidence l'impact de l'hypergravité sur la voie TLR-4, récepteur du LPS sur les lymphocytes B de souris. Nos résultats obtenus par qPCR confirment dans l'ensemble ceux de l'étude transcriptomique. Tout d'abord, la comparaison des lymphocytes B de souris exposées à 2G avec ceux des souris contrôles montre que l'hypergravité a un effet sur la voie TLR-4, en absence de stimulation. Les gènes de la voie MyD88-indépendante, *Tram*, *Trif* et *RIP-1* ne sont pas impactés malgré de légères augmentations. Au contraire, une augmentation significative des transcrits de *Tirap*, *Irak4* et *Traf6* de la voie MyD88-dépendante est observée. Ces variations aboutissent à l'augmentation significative des transcrits de *p38* et à une tendance à l'augmentation de ceux de *JNK* appartenant à la voie MAPK et communs aux deux voies de signalisation TLR-4. L'activation de cette voie entraîne l'induction du facteur de transcription AP-1 [210], bien qu'aucun effet sur *Fos* ne soit observé ici. *Fos* est un gène qui code un facteur de transcription précoce impliqué dans la stimulation de la mitose [211]. Il est généralement peu exprimé en absence de stimulus. L'induction des facteurs de transcription n'est peut-être pas suffisamment importante pour entraîner l'augmentation de l'expression de *Fos* puisque les LB n'ont pas été stimulés par le LPS [212]. Ainsi, nos résultats montrent que l'hypergravité induit l'augmentation de l'expression de certains gènes de la voie TLR-4 MyD88-dépendante, impliquée dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

Ensuite, l'effet de la stimulation par du LPS a été étudié afin de quantifier son impact sur l'expression des gènes de la voie du TLR-4. Lorsque les souris n'ont pas été centrifugées, le LPS induit uniquement une augmentation de l'expression du gène *Tram* impliqué dans la voie MyD88-indépendante. En revanche, il a un impact important sur la voie MyD88-dépendante, des diminutions significatives des transcrits d'*Irak4* et de *Traf6* par rapport aux cellules avant stimulation sont observées. Ces diminutions aboutissent à des réductions très significatives des transcrits de *Map3k7ip2*, *p38* et *JNK*, communs aux deux voies. A la fin de la voie de signalisation, une très forte baisse de *Fos* est également constatée, ce qui confirme que ce gène est sensible au stimulus. Il y a donc une diminution globale de la voie de transduction du signal TLR-4 *via* la voie MyD88-dépendante chez les souris 1G 48 h après la stimulation. Lorsque les souris ont été soumises à l'hypergravité, la stimulation au LPS n'a pas d'effet sur la voie MyD88-indépendante. En plus de la réduction de l'expression d'*Irak4* et *Traf6* observée à 1G, les transcrits de *Tirap* sont également diminués dans la voie MyD88-dépendante des souris 2G après stimulation avec le mitogène. La baisse de l'expression des gènes communs aux deux voies chez les souris contrôles induite après stimulation est similaire à celle des souris soumises

à 2G. Ces variations affectent principalement la voie MyD88-dépendante. Ces résultats sont surprenants, car la stimulation par du LPS devrait activer la transduction du signal et non la réprimer chez les souris contrôles. En effet, il a été montré que la stimulation des lymphocytes B par le LPS induit leur prolifération, ainsi que la sécrétion d'anticorps et la production de cytokines pro-inflammatoires, et favorise également la capacité de ces cellules à présenter l'antigène aux lymphocytes Th en renforçant l'expression des molécules du CMH de classe II [8]. Ces cytokines sont induites par les voies MAPK et IKK du TLR-4 et il a été montré que celles-ci peuvent également être activées par la voie MyD88-indépendante [213]. Cependant, il faut souligner que cette étude compare l'expression des gènes de la voie TLR-4 dans des LB après 48h de stimulation *in vitro* avec du LPS à celle des LB non stimulés et non cultivés pendant 48h. Il se peut donc que le maintien en culture pendant 48 h ait une influence sur l'activation des lymphocytes. Il est possible que l'action du LPS sur l'expression des gènes associés au TLR-4 ne soit plus aussi importante à 48 h qu'au début de la culture. En effet, certains auteurs ont montré que les lymphocytes B ne répondaient pas tous dans les mêmes délais au ligand du TLR-4 [214, 215]. La transduction du signal se fait *in vivo* dans la première heure de stimulation pour les LB de la zone marginale de la rate et se prolonge plus tardivement pour ceux de la zone folliculaire [216]. De nouvelles études, avec comme groupe témoin des LB cultivés dans les mêmes conditions mais en l'absence de LPS, pourraient peut-être mettre en évidence les effets de la stimulation avec ce mitogène sur les voies TLR-4. De plus, il serait intéressant de renouveler cette analyse en arrêtant la stimulation dès les premières heures de la culture en présence de LPS car les 48 h de stimulation réalisée ici ont été choisies à partir des conditions expérimentales utilisées pour mesurer la réponse proliférative [126] et sont sans doute trop longues pour mettre en évidence des différences.

Enfin, une comparaison des cellules stimulées pendant 48 h des souris 1G et 2G n'a pas mis en évidence de différence dans l'expression des gènes impliqués dans les voies MyD88-dépendante et -indépendante, malgré l'expression des gènes *Tirap*, *Irak4* et *Traf6* un peu plus élevée à 2G. La diminution observée après la stimulation (**Figure 33A**) pourrait donc être compensée par l'augmentation significative due à l'hypergravité (**Figure 32A**). Concernant la voie MyD88-indépendante, seule l'expression de *Trif* est plus élevée après stimulation chez les souris exposées à 2G, par rapport aux individus contrôles, entraînant probablement les faibles augmentations non significatives de *RIP1* et de *JNK*. *Trif* est impliqué dans la sécrétion d'interférons de type I, en activant *IRF3* qui va ensuite interagir avec *NFκB* [217]. L'induction d'interférons de type I étant importante pour les réponses anti-virales et anti-bactériennes, pour la suite de cette étude, il serait donc intéressant d'étudier l'expression des gènes impliqués dans

la voie IKK [218] et celle des gènes codant ces cytokines. Enfin, l'absence de diminution des transcrits des différents gènes impliqués dans la voie TLR-4 (**Figure 34**), alors que les LB prolifèrent moins après stimulation avec du LPS, pourrait s'expliquer par le faible pourcentage de cellules répondeuses. En effet, nous avons montré, grâce au suivi de la prolifération par cytométrie en flux, que seulement 20% des lymphocytes B totaux de la rate répondaient au LPS *in vitro*. Par ailleurs, il a été montré que le TLR-4 est associé à deux co-récepteurs, RP105 et MD-2, dont le rôle est essentiel pour la transduction du signal [219]. Il est donc possible que la diminution de la réponse des LB au LPS soit due aussi à une baisse de l'expression de ces co-récepteurs. Leur analyse à la surface des LB pourrait apporter des éléments de réponse.

Il est cependant clair que l'hypergravité affecte la voie TLR-4 MyD88-dépendante puisque trois des quatre transcrits de cette voie voient leur expression augmenter dans les lymphocytes B non stimulés des souris 2G (**Figure 32A**), alors que la voie Myd88-indépendante n'est pas affectée par l'hypergravité. Pour compléter cette étude, il faudrait s'intéresser à d'autres gènes impliqués dans la voie TLR-4, qui est régulée par de multiples complexes protéiques, comme les molécules de la voie IKK, ainsi qu'aux phosphorylations des protéines impliquées dans ces voies de signalisation. Il serait également intéressant de réaliser le dosage des cytokines sécrétées après stimulation au LPS comme l'IL-1 β , le TNF α , l'IL-6, l'IL-8, les interférons α et β ou encore les chimiokines comme MIP-1 α et MIP-1 β afin de compléter ces données.

CHAPITRE 4 : LES EFFETS DE STRESS CHRONIQUES ULTRA LEGERS SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE ADAPTATIF

Les effets de stress chroniques ultra légers sur les lymphocytes de la rate

I. Introduction

Comme nous l'avons exposé précédemment, les recherches menées en psychoneuro-immunologie ont montré que les dérégulations immunitaires induites par un stress prolongé pouvaient avoir des conséquences significatives sur la santé, telles que l'induction de l'inflammation [220, 221], la diminution de l'efficacité des vaccins, le ralentissement de la cicatrisation, la réactivation de virus latents et l'aggravation de maladies infectieuses [22, 71]. La plupart de ces conséquences ont été également observées chez les astronautes au cours des missions spatiales de longue durée [22].

Divers modèles de stress chroniques ont été mis en place afin de comprendre leur impact sur le système immunitaire et le système nerveux central. Parmi ceux-ci, le modèle de stress chronique léger ou Chronic Mild Stress (CMS) [124] a permis l'étude chez les rongeurs de l'impact d'une exposition chronique à une combinaison de facteurs de stress environnementaux et sociaux de faible intensité associés à une privation de nourriture. Le CMS est généralement utilisé pour engendrer les principaux symptômes retrouvés lors de la dépression chez l'Homme tels qu'une anhédonie, une perte de la masse corporelle [222], des troubles du sommeil [223, 224] et des perturbations de l'activité locomotrice selon le rythme circadien [225]. Silberman *et al.* ont montré qu'il induisait aussi une diminution de la réponse proliférative des lymphocytes T *in vitro* et une plus faible réponse humorale *in vivo* associées à une modification de la réactivité des lymphocytes T en réponse aux hormones de stress et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [63, 226].

Lors de missions spatiales, les astronautes sont soumis à une multitude de stress environnementaux. Il est donc nécessaire de recréer au sol une combinaison de stress chroniques légers pour déterminer quels sont leurs effets sur l'immunité spécifique et ainsi les différencier de ceux induits par les modifications de la gravité. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle Chronic Ultra Mild Stress (CUMS) qui permet de recréer un environnement stressant sans toutefois entraîner un état dépressif [125]. Le principe repose sur l'exposition chronique à différents facteurs de stress ultra légers, sans privation de nourriture, qui vont être répétés de façon imprévisible tous les jours [125]. Ce modèle est plus adapté que le CMS pour mimer les stress auxquels sont confrontés les astronautes durant une mission. De nombreuses études comportementales ont été menées sur les fonctions cognitive [125, 227] et locomotrice [228]

après une exposition au CUMS. Cependant, aucune étude n'a été réalisée au niveau du système immunitaire et notamment des lymphocytes, de leur réponse lymphoproliférative *in vitro* et de la production d'anticorps et de cytokines.

II. Objectifs de l'étude

Notre étude a donc eu pour but de déterminer si des stress chroniques ultra légers (CUMS) pouvaient avoir des conséquences négatives sur le système immunitaire spécifique. Pour cela, des souris ont été exposées au CUMS pendant 21 jours.

Le premier objectif a été de déterminer si ce traitement entraînait une réponse au stress par l'activation de l'axe HPA ou si les souris pouvaient s'adapter à cet environnement. Pour cela, le dosage de la corticostérone sérique et l'évaluation de l'involution du thymus ont été effectués. Les principaux isotypes d'immunoglobulines ont été aussi quantifiés dans le sérum.

Le second objectif a été de mesurer le statut inflammatoire dans le système immunitaire. A cette fin, les cytokines de type pro-inflammatoire ont été mesurées dans le sérum et dans les cellules spléniques juste après le sacrifice des souris.

Enfin, le dernier objectif a été d'étudier l'impact du CUMS sur les populations lymphocytaires spléniques et sur leur réponse lymphoproliférative *in vitro*. Les concentrations de cytokines de type Th1 ou Th2 ont été dosées dans le sérum et dans les surnageants de culture de splénocytes stimulés.

III. Matériels et méthodes

III.1. Stress chroniques ultra légers

Les expérimentations ont été menées sur des souris mâles C57Bl/6N-Crl de 8 semaines (Laboratoires Charles River). A leur arrivée, les animaux ont été placés par groupe de 5 par cage et maintenus sous conditions standards dans l'animalerie : un cycle jour/nuit de 12 h : 12 h et de l'eau et de la nourriture *ad libitum* pendant une semaine. Puis, les animaux soumis à des stress chroniques (groupe Sc) ont été isolés de façon aléatoire et hébergés dans une pièce séparée pour éviter tout contact avec le groupe d'animaux contrôles (groupe C). Chaque groupe était constitué de 10 souris. La durée totale de chaque expérimentation a été fixée à 21 jours et les expérimentations ont été répétées trois fois.

Les animaux du groupe Sc ont été soumis à des facteurs de stress ultra légers (**Tableau 6**) dont : des périodes répétées d'inclinaison de la cage (30°) ; un confinement dans de petites

cages ; deux périodes de 2 h de cohabitation par paires sans contact ; une nuit avec un accès difficile à la nourriture (sans réduction de la ration alimentaire quotidienne) ; un éclairage continu pendant la nuit ; une nuit dans une cage souillée (50 mL d'eau dans 1 L de litière de sciure de bois). Les animaux ont également été placés dans un cycle jour/nuit inversé du vendredi soir au lundi matin. Un minimum de 2 h d'intervalle entre chaque période de stress a été respecté. Ces facteurs de stress sont répartis sur une période d'une semaine et ont été répétés tout au long des 3 semaines d'expérience.

	Matin	Après-midi	Nuit (de 18h à 9h)
Lundi		Inclinaison de la cage (2 h)	Accès difficile à la nourriture
Mardi	Confinement (1 h)	Cohabitation (2 h)	Lumière allumée
Mercredi	Inclinaison de la cage (2 h)	Confinement (2 h)	Inclinaison de la cage
Jeudi	Cohabitation (2 h)	Confinement (1 h)	Cage souillée
Vendredi	Confinement (1 h)	Inclinaison de la cage (2 h)	Cycle inversé
Week-end	Cycle inversé		

Tableau 6 : Protocole de stress chroniques ultra légers (CUMS). La procédure est basée uniquement sur des facteurs de stress environnementaux et sociaux. Les animaux stressés sont soumis à une séquence de stress ultra légers variés. Ces facteurs de stress ont été répétés tout au long des 3 semaines d'expérimentation.

Ces expérimentations ont été réalisées en accord avec la Législation Nationale (Décret n°2013-11) et la Directive Européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63/UE). Ce protocole a été approuvé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (numéro d'agrément : 00966.02).

III.2. Recueil des échantillons biologiques

Après 21 jours de procédure de stress, les souris ont été pesées et ensuite mises à mort par décapitation entre 8h00 et 10h00. Le recueil du sérum, du thymus et de la rate ont été réalisés comme indiqué au paragraphe III.2 du chapitre 2 (page 38).

III.3. Analyses des splénocytes par cytométrie en flux

La rate a été dissociée dans du RPMI 1640. La préparation cellulaire et le marquage par anticorps ont été réalisés comme indiqué au paragraphe III.3 du chapitre 2 (page 38). Après le marquage, les cellules ont été fixées avec 500 µL de paraformaldéhyde 2% avant d'être analysées par cytométrie en flux. L'immunophénotypage a été réalisé comme décrit au paragraphe III.3 du chapitre 2 (page 38). Les populations lymphocytaires spléniques ont été exprimées en pourcentages de la population lymphocytaire totale.

III.4. Mesure de la réponse lymphoproliférative par MTS

Pour évaluer les réponses prolifératives des lymphocytes de chaque souris, les cellules spléniques ont été ajustées à une densité de 10×10^6 cellules/mL de milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté, 100 U de pénicilline, 100 $\mu\text{g/mL}$ de Streptomycine et 2 mM de Glutamine (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été distribuées en quadruplicats de 50 μL dans les puits d'une microplaque 96 puits contenant 50 μL de milieu de culture sans ou avec mitogène à une concentration finale de 5 $\mu\text{g/mL}$. Le lipopolysaccharide (LPS) d'*E. coli* (Sigma-Aldrich) ou la Concanavaline A (ConA) de *C. ensiformis* (Sigma-Aldrich) ont été utilisés pour stimuler les lymphocytes B ou T, respectivement. Les cultures ont été incubées pendant 48 h à 37°C et 5% CO_2 . Puis, 20 μL de MTS 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (Promega Corporation), ont été ajoutés dans trois puits pour déterminer le nombre de cellules viables. Après 4 h d'incubation à 37°C 5% CO_2 , la densité optique (DO) a été mesurée à 490 nm en utilisant un lecteur de plaques (Bio-Rad). Un indice de prolifération (IP) a ensuite été calculé selon la formule : $\text{IP} = \text{DO } 490 \text{ nm des cellules stimulées} / \text{DO } 490 \text{ nm des cellules non stimulées}$. Pour chaque souris, le surnageant du quatrième puits de chaque condition de culture a été conservé à -80°C.

III.5. Dosage des immunoglobulines, de la corticostérone et des cytokines

Les concentrations en IgA, IgG et IgM sériques ont été déterminées selon le protocole du kit Mouse ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories Inc.). La concentration en corticostérone sérique a été mesurée sans procédure d'extraction selon le protocole du kit ELISA Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays). Dans chaque cas, les concentrations ont été calculées en utilisant une courbe polynomiale d'ordre 4 et exprimées en $\mu\text{g/mL}$ pour les immunoglobulines et en ng/mL pour la corticostérone.

Les concentrations en cytokines dans les surnageants de culture et dans les sérums ont été quantifiées selon le protocole du kit ProcartaPlex Mouse Essential Th1/Th2 cytokine Panel (Affymetrix) en utilisant l'instrument Bio-Plex[®] (Bio-Rad). Les concentrations ont été calculées en utilisant le logiciel du Bio-Plex[®] (Bio-Rad) et ont été exprimées en pg/mL .

III.6. Tri des splénocytes avant ou après stimulation au LPS

Après dissociation de la rate et lyse des globules rouges, les splénocytes ont été partagés en deux lots de 50×10^6 cellules spléniques chacun. Les LB ont été isolés du premier lot (échantillons J0 après le sacrifice) et du second lot (échantillons J2 après 48 h de culture) par

sélection négative grâce au kit CD43 (Ly-48) MicroBeads mouse (Miltenyi Biotec) comme indiqué au paragraphe III.3 du chapitre 3 (page 73). Les cellules spléniques de 2 ou 3 souris ont été mélangées avant de réaliser le tri. Les LB et les autres splénocytes issus du tri ont été conservés à -80°C.

III.7. Analyses transcriptomiques des splénocytes dépourvus de LB

III.7.1. Extraction des ARN

Les splénocytes dépourvus de LB ont été lysés dans un volume adéquat de tampon de lyse avant d'extraire l'ARN total de 10×10^6 de cellules selon le protocole du RNeasy Mini Kit de Qiagen (Venlo). L'ARN total a été quantifié grâce à un NanoDrop (ThermoFisher). L'absorbance a été mesurée à 260, 230 et 280 nm pour déterminer la concentration et la pureté des échantillons. Le rapport A260/A280 doit être proche de 2,0 pour s'assurer de l'absence de protéine et le rapport A260/A230 doit être compris entre 2,0 et 2,2 pour s'assurer de l'absence de solvant organique. Les ARN ont été aliquotés et conservés à -80°C.

III.7.2. Transcription inverse

La transcription inverse des ARN des splénocytes dépourvus de LB a été réalisée dans des tubes avec deux mélanges de réactifs comme indiqué au paragraphe III.4.2 du chapitre 3 (page 73). Les ADNc ont été conservés -20°C.

III.7.3. PCR quantitative en temps réel

Les ADNc d'intérêt ont été quantifiés par PCR quantitative en temps réel, ou qPCR, par rapport aux ADNc des gènes de référence en utilisant un mastercycler Realplex² (Eppendorf) comme indiqué au paragraphe III.4.4 du chapitre 3 (page 74).

Après validation avec le logiciel BestKeeper, trois gènes de référence ont été retenus : Eef2, Ppia et Rpl13 (**Tableau 4** page 75). Les transcrits de l'IL-1 β , l'IL-6, Fas et FasL ont été quantifiés dans les cellules de la rate ne contenant plus de LB. Les séquences des couples d'oligonucléotides choisis sont listées dans le **tableau 7**.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence de l'oligonucléotide (5'-3')	Température d'hybridation
IL-1 β sens	TTGACGGACCCCAAAAGATG	63°C
IL-1 β anti-sens	AGAAGGTGCTCATGTCCTCA	
IL-6 sens	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	63°C
IL-6 anti-sens	TGCAAGTGCATCATCGTTGTTCA	
Fas sens	AGAGCATGGTTTAGAGGTGGA	60°C
Fas anti-sens	AACAAAACAAGGATGGTCAAC	
FasL sens	GGCCCATTTAACAGGGAACC	62°C
FasL anti-sens	CAGAGCGGTTCCATATGTGTC	

Tableau 7 : Séquences des oligonucléotides utilisées pour quantifier les ADNc des gènes d'intérêt.

III.8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS v13.0 (SPSS Inc.). La normalité et l'homogénéité des variances ont été évaluées grâce aux tests de Kolmogorov-Smirnov et Levene. Lorsque les valeurs suivaient une loi normale, les comparaisons des résultats entre les groupes de souris ont été effectuées avec un test de Student. Quand les données n'étaient pas distribuées selon une loi normale, les comparaisons ont été effectuées avec un test de Mann-Whitney. Pour indiquer la tendance et la significativité, les valeurs de $p < 0,10$ et $< 0,05$ ont été respectivement sélectionnées. Toutes les données ont été présentées sous forme de moyennes avec l'erreur standard à la moyenne (ESM).

IV. Résultats

IV.1. Evaluation de l'état de stress

Afin d'évaluer l'état de stress des souris après 21 jours de CUMS, la concentration en corticostérone sérique et les masses relatives du thymus et de la rate ont été mesurées (**Tableau 8**). La concentration en corticostérone chez les souris exposées au CUMS (groupe Sc) est similaire à celle des souris contrôles. Aucune différence significative n'apparaît entre les masses relatives du thymus des deux groupes de souris. Une diminution significative est observée pour la masse relative de la rate chez les souris Sc bien que le nombre de cellules nucléées dans la rate ne varie pas entre les deux groupes. Ces données montrent que les souris se sont adaptées au CUMS.

Individus	Concentration en corticostérone (ng/mL)	Masse relative du thymus (mg/g)	Masse relative de la rate (mg/g)	Nombre de cellules spléniques nucléées ($\times 10^6$)
Contrôles	35,56 \pm 6,5	2,16 \pm 0,09	2,99 \pm 0,14	97,5 \pm 12,1
Stressés	35,64 \pm 7,5	2,08 \pm 0,10	2,59* \pm 0,07	99,5 \pm 7,5

* $p = 0,0174$ versus Contrôles.

Tableau 8 : Concentrations en corticostérone sérique, masses relatives des organes lymphoïdes et cellularité splénique après 21 jours de CUMS. La concentration en corticostérone a été mesurée par ELISA. Les masses relatives des organes lymphoïdes ont été calculées en rapportant la masse de l'organe à la masse corporelle de chaque souris. Le nombre de cellules spléniques nucléées a été calculé après lyse des globules rouges. $n = 6$ et 8 souris contrôles et stressées. Les données sont des valeurs moyennes \pm ESM. Une différence statistiquement significative a été observée après un test de Student.

IV.2. Concentrations en immunoglobulines sériques

Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes expérimentaux pour les concentrations sériques en IgM et IgG (**Figure 35A et B**). Par contre, une augmentation significative d'un facteur de 2 est détectée pour les concentrations en IgA chez les souris Sc (**Figure 35C**).

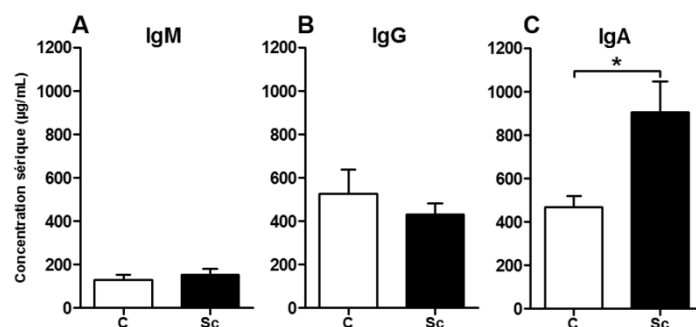


Figure 35 : Concentrations des trois principaux isotypes d'immunoglobulines sériques après 21 jours d'expérimentation. Les concentrations des isotypes (A) IgM, (B) IgG et (C) IgA ont été mesurées par ELISA. $n = 6$ et 8 souris contrôles (C) et soumises au CUMS (Sc). Aucune différence significative n'a été observée après un test de Student pour les IgG et IgM. Une différence statistiquement significative a été observée après un test de Mann-Whitney pour les IgA. * $p < 0,05$.

IV.3. Concentrations en cytokines sériques

Pour certains échantillons de sérum, l'intensité de fluorescence était trop faible et la concentration ne pouvait donc pas être calculée. Ces concentrations ont été définies comme égales à 0 pg/mL (**Figure 36**). Malgré une baisse des concentrations des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-6 et le TNF α , aucune différence statistique n'est observée (**Figure 36A et B**). Pour les cytokines Th1, il n'y a pas de différence pour l'IFN γ (**Figure 36C**) alors qu'il y a une tendance à la baisse pour l'IL-12p70 chez les souris Sc (**Figure 36D**). Les concentrations d'IL-4 et d'IL-5, cytokines de type Th2, ne sont pas modifiées malgré une légère augmentation de l'IL-4 chez les souris Sc (**Figure 36E et F**). Cependant, le rapport Th1/Th2 calculé avec l'IL-12p70 et l'IL-4 est divisé par 2 chez les souris Sc, il passe de 6,7 à 3,3.

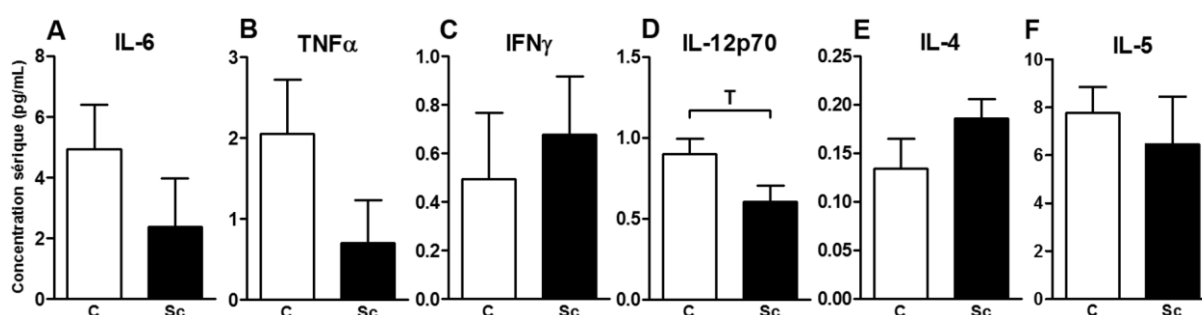


Figure 36 : Concentrations en cytokines sériques après 21 jours de CUMS. Les concentrations des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α), de type Th1 (IFN γ , IL-12p70) et Th2 (IL-4, IL-5) dans le sérum ont été mesurées avec un Bio-Plex $^{\text{®}}$ et le kit ProcartaPlex $^{\text{TM}}$ d'Affymetrix. $n = 5$ et 7 souris contrôles (C) et soumises au CUMS (Sc). Aucune différence significative n'a été observée après un test de Student. $^{\text{T}}$ $p < 0,1$.

IV.4. Populations de lymphocytes B et T dans la rate

Les différentes sous-populations lymphocytaires ont été déterminées par cytométrie en flux au sein des lymphocytes viables. La baisse de 7% du nombre de lymphocytes totaux chez les souris Sc n'est pas statistiquement significative (**Figure 37A**).

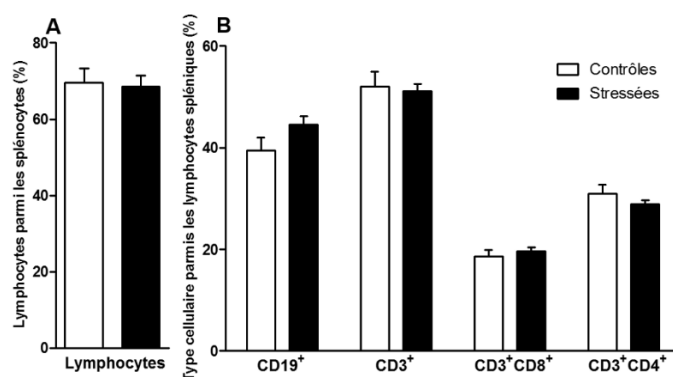


Figure 37 : Phénotypes des lymphocytes spléniques après 21 jours de CUMS. Après incubation avec des anticorps fluorescents, les populations cellulaires ont été identifiées par cytométrie en flux. **(A)** Les lymphocytes totaux viables ont été sélectionnés en utilisant une fenêtre taille/granulosité. **(B)** Les populations d'intérêt ont ensuite été exprimées comme un pourcentage de la population lymphocytaire. $n = 6$ et 8 souris contrôles et soumises au CUMS (Stressées). Aucune différence significative n'a été observée après un test de Student.

La **figure 37B** montre que les pourcentages de LB CD19⁺ et de LT totaux (CD3⁺) ne sont pas modifiés dans les deux groupes expérimentaux. Il en est de même pour les pourcentages des LTc (CD3⁺CD8⁺) et LTh (CD3⁺CD4⁺).

Comme il n'y a pas de différence entre les groupes au niveau du nombre de cellules spléniques nucléées (**Tableau 8**) et du pourcentage de lymphocytes totaux, les populations lymphocytaires ne varient pas non plus en nombres absolus. Après 21 jours de CUMS, il n'y a donc pas de modification significative de la proportion des sous-populations lymphocytaires dans la rate.

IV.5. Réponse lymphoproliférative et cytokines sécrétées après stimulation mitogénique

Après 48 h de stimulation *in vitro*, la réponse des LB stimulés avec du LPS (**Figure 38A**) et la réponse des LT stimulés avec de la ConA (**Figure 38B**) ne sont pas diminuées chez les souris stressées.

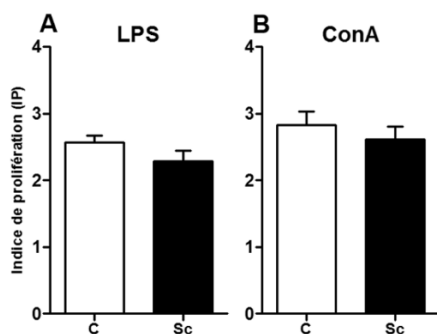


Figure 38 : Indices de prolifération après 48 h de stimulation *in vitro*. Les splénocytes ont été incubés avec 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de **(A)** LPS ou **(B)** ConA pendant 48 h. Ensuite, 20 μL de MTS ont été ajoutés dans les puits. Après 4 h d'incubation à 37°C, la densité optique a été mesurée afin de calculer les indices de prolifération. $n = 6$ et 8 souris contrôles (C) et soumises au CUMS (Sc). Aucune différence significative n'a été observée après un test de Student.

Après stimulation par le LPS, une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF α est observée avec une tendance statistique pour cette dernière (**Figure 39A et B**). En ce qui concerne les cytokines de type Th1, il n'y a pas de différence dans la sécrétion d'IFN γ entre les deux groupes, tandis que l'IL-12p70 a tendance à diminuer (**Figure 39C et E**). Enfin, pour les cytokines de type Th2, il y a une tendance à l'augmentation

de la sécrétion de l'IL-4 chez les souris Sc, contrairement à l'IL-5 pour laquelle il y a une diminution non significative (**Figure 39E et F**). L'augmentation de la concentration en IL-4 et la diminution en IL-6 se sont révélées significatives lorsque les cellules ont été stimulées en flasque lors de la dernière expérimentation (données non montrées). Il y aurait donc une baisse de la production de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de cytokines de type Th2 entraînant une diminution d'un facteur de 3 du rapport IL-12p70/IL-4 (il passe de 4 à 1,3) chez les souris Sc.

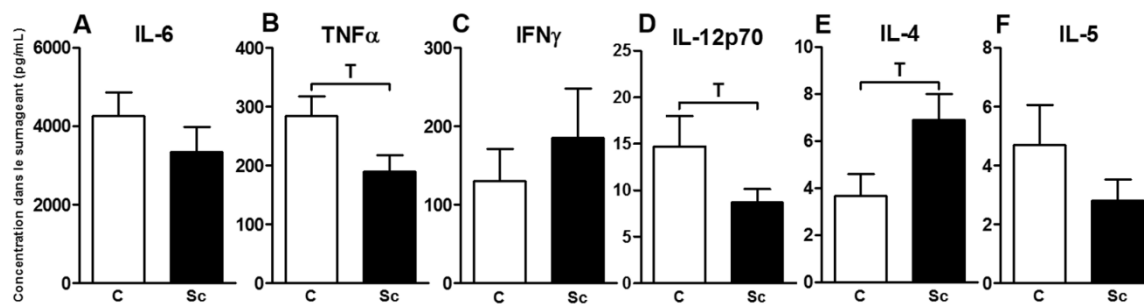


Figure 39 : Cytokines sécrétées par les lymphocytes spléniques stimulés par du LPS. Les splénocytes ont été incubés avec 5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS pendant 48 h. Les concentrations en cytokines dans les surnageants ont été mesurées avec un Bio-Plex[®] et le kit ProcartaPlex[™] d'Affymetrix. $n = 5$ et 7 souris contrôles (C) et soumises au CUMS (Sc). Aucune différence significative n'a été observée après un test de Student. ^T $p < 0,1$.

Après stimulation avec la ConA, la sécrétion d'IL-6 est presque deux fois plus faible chez les souris Sc, mais non significativement, alors que la baisse de la concentration du TNF α présente une tendance statistique (**Figure 40A et B**). Les cytokines de type Th1 sont diminuées dans les surnageants des cellules spléniques des souris Sc (**Figure 40C et D**) avec une tendance pour l'IL-12p70. Malgré une légère augmentation, il n'y a pas de différence de concentration pour l'IL-4 et l'IL-5 (**Figure 40E et F**). Cependant, le rapport IL-12p70/IL-4 est divisé par 2, il passe de 0,2 à 0,1 chez les souris Sc, indiquant une diminution de la sécrétion en cytokines de type Th1.

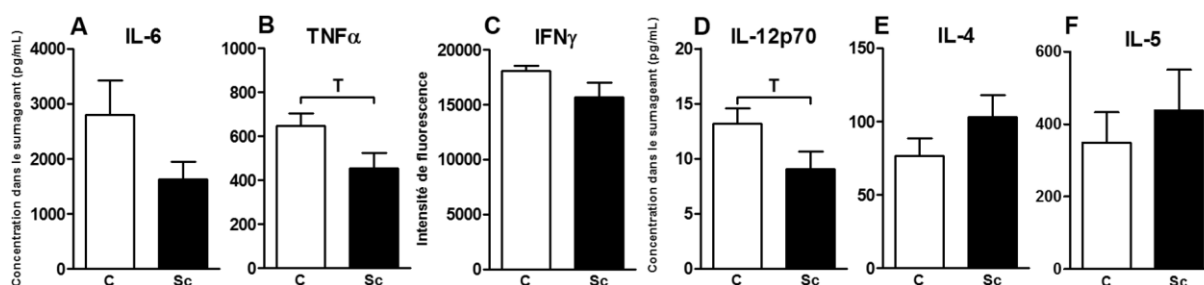


Figure 40 : Cytokines sécrétées par les lymphocytes spléniques stimulés par de la ConA. Les splénocytes ont été incubés avec 5 $\mu\text{g/mL}$ de ConA pendant 48 h. Les concentrations en cytokines dans les surnageants ont été mesurées avec un Bio-Plex[®] et le kit ProcartaPlex[™] d'Affymetrix. $n = 5$ et 7 souris contrôles (C) et soumises au CUMS (Sc). Aucune différence significative n'a été observée après un test de Student. ^T $p < 0,1$.

En résumé, 21 jours de CUMS induisent une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les splénocytes stimulés *in vitro* et inversent le rapport des cytokines Th1/Th2.

IV.6. Expression relative des transcrits d'IL-1 β et IL-6 dans les splénocytes

Afin de compléter les résultats précédents, l'expression relative des transcrits d'IL-6 et d'IL-1 β , qui n'a pas été dosée par Bio-Plex[®], a été quantifiée dans les cellules de la rate ne contenant plus de LB. Cette quantification a été réalisée après le sacrifice des animaux et après 48 h de stimulation au LPS.

La quantité d'ARNm codant l'IL-1 β est identique dans les deux groupes après 21 jours d'expérimentation (**Figure 41A**). Il en est de même lorsque les cellules ont été stimulées pendant 48 h avec du LPS (**Figure 41B**). Pour l'IL-6, avant la culture, la quantité de transcrits est diminuée non significativement de 60% chez les souris Sc (**Figure 41C**). Après 48 h de stimulation, la quantité de transcrits d'IL-6 est toujours plus faible de 60% chez les souris Sc et cette différence est désormais significative (**Figure 41D**). Cette diminution de transcrits d'IL-6 est cohérente avec celle de la concentration en IL-6 mesurée dans les sérums comme dans les surnageants des splénocytes stimulés pendant 48 h. Il semble donc que le CUMS diminue la production d'IL-6, alors qu'elle ne modifie pas celle de l'IL-1 β .

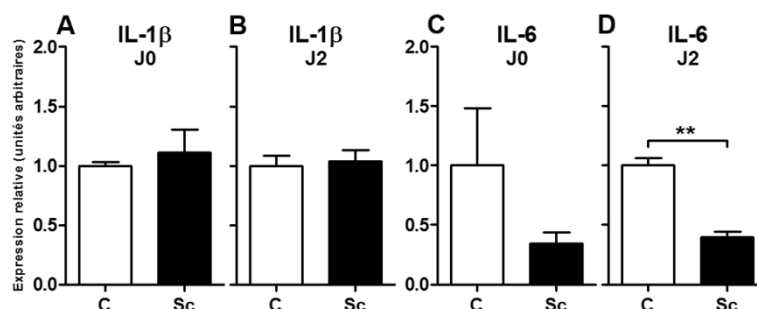


Figure 41 : Expression relative des transcrits de l'IL-1 β et de l'IL-6 dans les cellules spléniques dépourvues de LB. Les cellules ont été triées après 21 jours de CUMS avant (J0) ou après incubation durant 48 h avec 5 μ g/mL de LPS (J2). Les transcrits ont été analysés par qPCR. $n = 2$ lots de souris contrôles (C) à J0 et J2 et soumises au CUMS (Sc) à J0, $n = 3$ lots Sc à J2. Des différences statistiquement significatives ont été observées après un test de Student. ** $p < 0,005$.

IV.7. Expression relative des transcrits de Fas et FasL dans les splénocytes

La quantité d'ARNm codant Fas dans les cellules spléniques ne contenant plus de LB est similaire entre les deux groupes après le sacrifice et après la stimulation *in vitro* au LPS (**Figure 42A et B**). En revanche, après le sacrifice, la quantité d'ARNm de FasL est augmentée significativement chez les souris stressées (**Figure 42C**). Après 48 h de stimulation, à l'inverse, la quantité de transcrits de FasL a tendance à diminuer chez les souris stressées (**Figure 42D**). Ainsi, l'expression de FasL est augmentée après 21 jours de CUMS, suggérant une augmentation de l'induction de l'apoptose, alors que la stimulation au LPS pendant 48 h a pour conséquence de diminuer significativement la quantité de ce transcrit dans les cellules de souris

Sc. Le CUMS a donc un impact sur l'induction de l'apoptose des cellules de la rate, bien qu'aucune modification dans les populations lymphocytaires n'ait été observée.

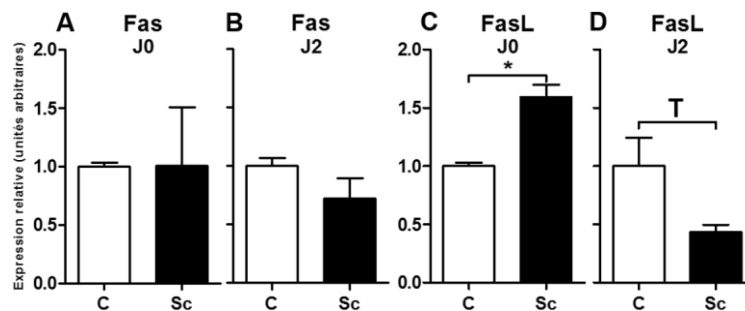


Figure 42 : Expression relative des transcrits de Fas et FasL dans les cellules spléniques dépourvues de LB. Les cellules ont été triées après 21 jours de CUMS avant (J0) ou après incubation durant 48 h avec 5 µg/mL de LPS (J2). Les transcrits ont été analysés par qPCR. $n = 2$ lots de souris contrôles (C) à J0 et J2 et soumises au CUMS (Sc) à J0, $n = 3$ lots Sc à J2. Des différences statistiquement significatives ont été observées après un test de Student. ^T $p < 0,1$; * $p < 0,05$.

V. Discussion

Cette étude montre que les souris soumises aux stress chroniques ultra légers ne présentent plus d'activation de l'axe HPA après 21 jours de traitement, car la concentration en corticostérone sérique n'est pas augmentée et il n'y a pas d'involution thymique. De plus, malgré une réduction de la masse splénique, il n'y a aucune modification, ni du nombre de cellules nucléées, ni du nombre de lymphocytes totaux. Chez des souris soumises à un protocole de stress plus intense, tel que le CMS, l'augmentation de la corticostérone est observée durant les deux premières semaines avant de revenir à une concentration proche de celle des contrôles [229, 230]. En revanche, le CMS induit une diminution significative de la masse relative du thymus chez la souris ou le rat [231, 232]. La combinaison de facteurs stressants utilisée dans le modèle CUMS permet donc aux souris de s'adapter, probablement parce que ces stimuli sont moins forts que ceux du CMS. En effet, dans ce dernier modèle, il y a des périodes de privation de nourriture qui représentent un stress important pour l'animal. Cette période de jeûne pourrait entraîner une modification du taux de leptine qui conduit à une réduction de la dépense d'énergie réservée alors aux organes vitaux. Elle pourrait aussi amener à la diminution des défenses immunitaires, comme une baisse du nombre de LT et LB et de leur réponse proliférative, associée à une augmentation de corticostérone [233]. Chez les souris stressées par CUMS, les proportions des LT et LB sont similaires alors qu'une diminution du nombre de LTh est accentuée lorsque l'intensité du stress est plus importante, comme le montrent les résultats obtenus après trois semaines d'exposition de souris au CMS [234]. Par ailleurs, il a été démontré que le CMS [226, 231], comme la dépression chez l'Homme [235, 236], n'avaient

pas d'impact négatif sur les LB, que ce soit au niveau du nombre de cellules ou de leur réponse proliférative *in vitro*. Silberman *et al.* ont démontré que les LT étaient plus sensibles aux hormones de stress libérées lors d'expositions prolongées au CMS ainsi qu'aux hormones thyroïdiennes [226, 229]. Notre étude montre que la réponse lymphoproliférative des LT, comme celle des LB, n'est pas impactée par trois semaines de CUMS, alors que chez des souris soumises au CMS pendant la même durée, la réponse des LT aux mitogènes est diminuée et celle des LB est augmentée [231]. De plus, les effets du CMS augmentent avec la durée d'exposition aux stress [229]. Il semble donc que le modèle de stress ultra légers ne soit pas suffisamment fort ou appliqué suffisamment longtemps pour entraîner les mêmes effets sur le système immunitaire adaptatif que le CMS.

Par ailleurs, il n'y a pas d'augmentation de l'expression des ARNm de Fas dans les splénocytes dépourvus de LB, c'est-à-dire les LT, les macrophages, les cellules dendritiques, avant et après stimulation chez les souris exposées au CUMS. En revanche, la quantité des ARNm du ligand de Fas est augmentée après le CUMS, suggérant ainsi une induction de l'apoptose plus importante. Cependant, l'expression de ce même gène est diminuée après stimulation *in vitro* des cellules étudiées. Ces données impliquent donc que les stress chroniques ultra légers ont un effet sur la régulation de l'apoptose des lymphocytes de la rate, sans que cela ne modifie la quantité des cellules dans l'organe après 21 jours d'expérimentation. L'étude de l'apoptose des LB qui ont été isolés permettra par la suite de déterminer si ces modifications de l'apoptose sont retrouvées sur ces cellules.

Chez les souris exposées au CUMS, les taux de cytokines sériques sont faibles, mais une diminution non significative des cytokines de type pro-inflammatoire et de type Th1 est observée. Après stimulation des cellules *in vitro* ces modifications se confirment de façon statistique, et pour certaines cytokines les différences sont plus importantes. En effet, la diminution du TNF α et de l'IL-6 observée dans le sérum se retrouve dans les surnageants. La quantité des ARNm de l'IL-6 est aussi réduite de façon significative dans les cellules après stimulation au LPS. Par contre, la quantité de transcrits d'IL-1 β n'est pas modifiée dans les cellules de la rate. De plus, lorsque les splénocytes sont stimulés par du LPS ou de la ConA la sécrétion de l'IL-12p70 est diminuée, tandis que celle de l'IL-4 est augmentée, comme dans le sérum. Ainsi, que ce soit dans le sérum ou dans les surnageants de culture, le rapport des cytokines de type Th1/Th2, calculé avec les concentrations des cytokines IL-12p70 et IL-4, est diminué au minimum d'un facteur 2. Cette diminution de l'expression des cytokines de type Th1, notamment l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN γ , a déjà été décrite en conditions de stress chronique chez les modèles animaux comme chez l'Homme, et chez les astronautes [116, 168].

L'ensemble de ces résultats montre donc un effet anti-inflammatoire des stress chroniques ultra légers.

La quantification, par nos collègues de l'équipe INSERM UMR 894 (UPMC, Paris), des ARNm de cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau a mis en évidence une diminution de leur expression chez les souris exposées au CUMS. En effet, dans l'hippocampe, l'IL1 β , l'IL-6 et le TNF α sont diminuées très significativement (données non montrées). Ces résultats sont opposés à ceux observés dans le modèle CMS [221] comme dans la dépression chez l'Homme [237]. En effet, Mormède *et al.* ont montré que, chez des souris soumises pendant trois semaines au CMS, le taux d'IL-6 était augmenté dans le système nerveux central [238]. De plus, de nombreuses études ont associé l'expression des cytokines pro-inflammatoires à la dépression [239, 240]. Il serait donc intéressant de quantifier d'autres cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 et l'IL-13 dans le système immunitaire afin de confirmer cette inversion de la balance pro-/anti-inflammatoire en condition de stress ultra légers [221]. L'ensemble de nos résultats montre donc pour la première fois que si le stress chronique est de très faible intensité et ne dure que 3 semaines, il n'entraîne pas de réponse pro-inflammatoire au niveau du système nerveux central (SNC), ni au niveau du système immunitaire et n'a pas d'impact sur les lymphocytes de la rate.

Enfin, dans notre étude, la concentration des IgA sériques est significativement augmentée chez les souris stressées, comme chez les personnes stressées de manière chronique ou même sévère [241], chez les astronautes et chez les pleurodèles immunisés lors de la mission Genesis [116, 118]. Les IgA sont actuellement considérées comme de bons indicateurs de réponse aux stress chroniques [242], notamment grâce à leur capacité à persister longtemps après l'exposition à un stress chronique [243], mais aussi à la possibilité de les doser dans la salive [244]. On peut donc supposer que ce taux augmenté d'IgA dans le sérum des souris CUMS suggère qu'elles ont probablement été stressées au début du traitement, puis qu'elles se sont adaptées.

Il apparaît donc que les stress chroniques ultra légers affectent très peu les composants du système immunitaire adaptatif et auraient un effet anti-inflammatoire sur le SNC. La balance Th1/Th2 et la production d'IgA sont modifiées, comme chez les astronautes ou les personnes stressées. Par contre, les stress chroniques ultra légers ne peuvent expliquer les fortes diminutions du nombre de LB et de leur réponse chez des souris soumises à des variations de gravité ou chez les astronautes.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

Discussion générale et perspectives

Un affaiblissement significatif du système immunitaire a été observé chez l'Homme comme dans d'autres espèces lors des missions spatiales [81]. Au cours de ces missions de longue durée, les conditions environnementales, notamment les changements de gravité, sont sources de stress chroniques. Or, il est clairement établi que les stress chroniques sont immunosuppresseurs et qu'ils peuvent prédisposer à certaines maladies, voire les aggraver. Les impacts sur l'immunité humorale ont été peu étudiés jusqu'à présent. Devant le rôle majeur des anticorps dans la protection de l'organisme, il apparaît essentiel d'identifier les mécanismes impactés par cet environnement. Les premiers travaux de l'équipe ont montré qu'un séjour dans l'espace affectait la transcription des gènes codant les chaînes lourdes des anticorps d'amphibien et que la maturation de l'affinité des anticorps chez des adultes immunisés dans cet environnement était modifiée [118–121]. Récemment, elle a mis en évidence qu'une augmentation de la gravité altérait les lymphocytes murins de manière différentielle, les lymphocytes B étant plus sensibles que les lymphocytes T.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient de déterminer précisément les effets de la modification de la gravité ou de la combinaison de plusieurs stress chroniques légers sur les lymphocytes de souris afin d'en identifier les origines. Pour ces études, 3 modèles ont été utilisés : un modèle de micropesanteur simulée, un modèle d'hypergravité et un modèle de stress ultra légers. Dans chaque expérience, des souris mâles de la même lignée ont été soumises durant 3 semaines à l'un de ces modèles. La comparaison de l'ensemble des résultats permet de mettre en évidence l'importance de la modification de la gravité sur les lymphocytes par rapport à celle des stress combinés légers (**Tableau 9**).

En effet, la suspension anti-orthostatique entraîne de profondes modifications des populations lymphocytaires matures au sein de la rate des souris. Une diminution de 25% des splénocytes est observée après 21 jours de traitement. Le nombre de lymphocytes T totaux n'est pas modifié, en revanche, celui des lymphocytes B est réduit de 60%, diminuant ainsi le rapport LB/LT dans la rate. De plus, bien que le nombre de LT totaux ne soit pas modifié, la baisse du nombre de LTh entraîne une diminution du rapport LTh/LTc. Les mêmes modifications sont observées chez les souris attachées non suspendues, mais elles sont plus faibles. La position anti-orthostatique a donc un effet supplémentaire à celui de la contrainte due à l'attache. Nos résultats sont en accord avec les autres études menées soit au sol avec le modèle de suspension anti-orthostatique, soit en vol spatial [108, 141]. Cette réduction du nombre de LB semble être

médiée par une apoptose et/ou une redistribution leucocytaire, comme l'ont montré Wei *et al.* [141], mais elle pourrait également être due à un affaiblissement de la lymphopoïèse B dans la moelle osseuse. En effet, un important remodelage osseux a été démontré en micropesanteur réelle ou simulée [81, 198].

<i>Etudes</i>	<i>Modèles</i>	Suspension anti-orthostatique	Hypergravité 2G	CUMS
Gains de masse		↘ [174, 245]	↘ [126]	NR
Masses organes lymphoïdes		= [174, 245]	= [126]	Rate ↘
Corticostérone		= [174, 245]	= [126]	=
Immunoglobulines		= [174, 245]	IgG, IgA ↗ [126]	IgA ↗
Cytokines sériques		= [174]	IL-2 ↘ [126]	Th1 ↘
Cytokines SNC		NR	NR	Pro-inflammatoires ↘
Lymphopoïèse		Pré-B ↘ [245]	NR	NR
Populations lymphocytaires		LB ↘ [174]	NR	=
Réponses lymphoprolifératives		LB ↘ [174, 245] LT ↘ [245]	LB ↘ LT ↘ [126]	=
Sécrétion de cytokines		= [174]	NR	Pro-inflammatoires ↘ Th1 ↘ Th2 ↗
Voie TLR-4		NR	MyD88-dépendante 2G ↗	NR
Voie TLR-4 + 48 h LPS		NR	MyD88-dépendante 2G ↘	NR

Tableau 9 : Principaux résultats obtenus concernant l'impact des trois modèles utilisés sur le système immunitaire adaptatif murin. Les résultats de chaque étude sont présentés par comparaison avec les souris contrôles de chaque modèle. NR = étude non réalisée pour le modèle concerné.

Notre étude de la production de lymphocytes B et T au cours des 21 jours de suspension de souris mâles adultes a permis de vérifier cette hypothèse de l'atteinte de la lymphopoïèse B. Les cellules pro-B et pré-B sont significativement diminuées tout au long de la suspension et une fuite des progéniteurs lymphoïdes hors de la moelle osseuse est observée, tandis qu'aucune perturbation de la lymphopoïèse T dans le thymus n'a été notée. De plus, cette réduction de la lymphopoïèse B est associée à une baisse de la signalisation *via* l'IL-7 et de l'expression de régulateurs clés de la différenciation des cellules B [4]. Si nos travaux mettent en lumière les mécanismes moléculaires impactés par la suspension, les facteurs responsables ne sont pas encore clairement identifiés. Le remodelage osseux consécutif à la suspension entraîne très probablement des modifications de la production de certains facteurs indispensables à l'homéostasie de ce tissu. Nous avons déjà évoqué le rôle probable de la leptine dans la baisse de la production de lymphocytes B dans la moelle osseuse [246] puisque sa production est sans doute diminuée lors de stress mécaniques [184]. De plus, Dias *et al.* ont démontré le rôle stimulateur de cette hormone sur la production de CSH chez les souris, renforçant notre hypothèse [247]. Par ailleurs, récemment, Wang *et al.* ont mis en évidence le rôle clé de

l'ostéopontine sur ces paramètres chez des souris ostéopontine^{-/-} exposées à la suspension anti-orthostatique [136]. Ces dernières ne présentent pas de baisse de masse corporelle, ni du nombre de lymphocytes B et T dans la rate et leur production dans la moelle osseuse n'est pas altérée. Cette glycoprotéine a été identifiée tout d'abord en tant que matrice du tissu osseux [248, 249], puis ensuite en tant que cytokine produite notamment par les LT activés [250]. De plus, son expression serait augmentée chez les souris exposées à la suspension anti-orthostatique et pourrait être en grande partie responsable de la perte osseuse [251]. Cette protéine semble avoir un rôle clé non seulement au niveau du tissu osseux, mais aussi dans la production des lymphocytes. Par ailleurs, Wang *et al.* ont également mis en évidence le rôle de l'ostéopontine sur la perte de masse corporelle et l'atrophie du thymus et de la rate qui apparaissent dans les premiers jours de la suspension chez la souris [136]. Ils suggèrent qu'elle aurait une fonction apoptotique sur les lymphocytes. Afin de compléter nos données, il serait donc nécessaire de s'intéresser aux cellules stromales de la niche endostéale qui sont au contact direct des progéniteurs B les plus impactés par la suspension [182, 183] et qui pourraient sécréter cette molécule. Il serait également intéressant d'évaluer l'apoptose des lymphocytes B matures dans la rate, ainsi que l'expression des molécules d'adhésion et des chimiokines impliquées dans la circulation de ces cellules, qui peuvent être modifiées en présence d'une forte concentration d'ostéopontine [252]. En effet, même si la lymphopoïèse B est affectée, elle n'explique pas à elle seule la baisse de 60% des lymphocytes B dans la rate des souris de 3 mois.

Nos analyses de la réponse lymphoproliférative *in vitro* des splénocytes ont également mis en évidence que les LB étaient plus affectés que les LT par la suspension, et ce, dès le 6^{ème} jour comme l'a montré l'expérience réalisée avec les souris de 5 mois. La réponse des lymphocytes B à une stimulation avec du LPS est diminuée de 40% après 21 jours de suspension chez les souris de 3 mois (**Tableau 9**). La réponse des lymphocytes B est donc affectée peu de temps après le début de la suspension, ce qui pourrait expliquer pourquoi des souris suspendues et infectées par des bactéries à Gram- présentent un taux de mortalité plus élevé [142, 162]. Une baisse de la réponse des lymphocytes T est également observée chez les souris de 5 mois, celle-ci étant significative pour les populations de lymphocytes T totaux et de lymphocytes T cytotoxiques. Cette diminution a également été observée avec des animaux ayant séjourné dans l'espace ou sur des cellules cultivées en micropesanteur simulée [163, 164]. Cet affaiblissement de la réponse lymphoproliférative plus important pour les LB que pour les LT a aussi été démontré après 21 jours d'hypergravité à 2G chez la souris [126]. Ainsi, les lymphocytes B et T réagissent différemment face à une modification de la gravité. La voie d'activation du LPS *via* le TLR-4 serait donc impactée par les modifications de la gravité.

C'est pourquoi le deuxième axe de ce travail a porté sur l'étude des voies de signalisation du LPS dans des lymphocytes B de la rate de souris soumises pendant 21 jours à une hypergravité de 2G. Dans un premier temps, une analyse transcriptomique a permis de mettre en évidence des variations de l'expression de certains gènes de la voie TLR-4, majoritairement de la voie MyD88-dépendante. Nos quantifications par qPCR des transcrits des gènes des voies MyD88-dépendante, -indépendante et MAPK ont montré que l'hypergravité de 2G augmentait l'expression de gènes impliqués dans la voie MyD88-dépendante du TLR-4 en absence de toute stimulation *in vitro* (**Tableau 9**), qui pourrait aboutir à une activation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [9]. Or, lors de notre précédente étude chez les souris centrifugées à 2G, aucune augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le sérum n'a été observé et seule l'IL-2 était diminuée [126]. Les cytokines sécrétées par les cellules stimulées au LPS n'ont pu être dosées dans les surnageants des cellules des souris exposées à 2G pour l'instant. Par ailleurs, notre étude a été réalisée sur un faible nombre d'individus dont les cellules ont dû être mélangées suite aux contraintes techniques. Elle devra donc être reproduite afin de compléter ces premiers résultats. De façon surprenante, une diminution des transcrits des gènes impliqués dans la voie MAPK a été observée dans nos deux groupes de souris après stimulation. De nouvelles expériences, avec notamment une culture témoin de splénocytes sans LPS et différents temps d'incubation pourront permettre d'étudier plus précisément la signalisation du TLR-4 sans stimulation. Il sera également important de doser les cytokines et chimiokines, effecteurs finaux de la voie de signalisation du TLR-4, produites dans le surnageant de culture par les LB en présence de LPS. Enfin, pour poursuivre les investigations et déterminer quel mécanisme inhibe la prolifération des LB, la même étude sera menée sur des LB de souris soumises à une suspension anti-orthostatique qui, tout comme l'hypergravité à 2G, altère la réponse des lymphocytes B au LPS. Si ces résultats sont préliminaires, la banque de données issue de l'analyse transcriptomique constitue une base de travail solide qui permettra de rechercher des variations d'autres gènes, par exemple ceux codant des récepteurs d'hormones de stress exprimés par les LB.

Il est important de souligner que dans ces deux modèles, suspension anti-orthostatique et centrifugation à 2G, les souris se sont adaptées au traitement. En effet, le taux de corticostérone sérique n'est pas augmenté et la masse thymique n'est pas diminuée. Ce n'est donc pas une activation prolongée de l'axe HPA qui peut expliquer l'effet négatif de la modification de la gravité sur le système immunitaire spécifique. Cependant, afin de discriminer les effets d'une combinaison de stress chroniques légers, proches de ceux rencontrés par les astronautes, par rapport à ceux induits par des modifications de la gravité, le troisième axe de ce travail a utilisé

le modèle CUMS. Les résultats obtenus ont confirmé que ce type de stress hétérotypique n'affecte ni la proportion des lymphocytes dans la rate, ni leur réponse aux mitogènes (**Tableau 9**). Or, après des stress chroniques légers (CMS), proches du modèle CUMS, il a été montré que la réponse des LT était diminuée et celle des LB était augmentée à partir de la troisième semaine de traitement [229, 231]. Le modèle CUMS ne serait donc pas assez intense et/ou pas assez prolongé pour affecter les lymphocytes dans nos expériences. De plus, comme dans les deux autres modèles expérimentaux, aucune augmentation de la concentration en corticostérone n'a été observée. Cependant, la concentration en IgA circulantes est augmentée après 21 jours d'exposition au CUMS, comme après un séjour prolongé dans l'espace ou 21 jours d'exposition à 2G [116, 126], tandis que l'exposition à la suspension n'a pas modifié le taux des IgA. Cet isotype d'immunoglobuline est maintenant considéré comme un bon indicateur d'une activation de l'axe HPA [243] car cet isotype d'immunoglobulines persiste plus longtemps que la corticostérone après une exposition au stress [242]. Donc, nos résultats montreraient que les souris s'adaptent plus tardivement aux stress multifactoriels du CUMS ou à celui de l'hypergravité qu'à celui dû à la suspension anti-orthostatique. Il serait toutefois intéressant de mesurer le taux d'IgA dès le début des traitements, afin d'obtenir une cinétique de la réponse des animaux face aux perturbations de leur environnement. Pour comprendre comment ces stress modulent l'expression de cet isotype, il serait également nécessaire d'analyser, par exemple, le promoteur des gènes codant les chaînes lourdes de cet anticorps. Par ailleurs, des dosages de l'ostéopontine pourraient apporter des précisions quant à l'adaptation des souris à ce type de stress multifactoriels, qui ne provoque pas de modification au niveau du tissu osseux, au contraire de ceux engendrés par la modification de la gravité. En effet, les travaux de Wang *et al.* ont montré que cette molécule jouait un rôle clé, non seulement dans l'homéostasie du tissu osseux en cas de stress mécanique, mais aussi entre le système immunitaire et le système nerveux central, par le biais de la régulation de la production d'ACTH et de la corticostérone [136]. Elle peut être sécrétée non seulement dans le tissu osseux, mais également dans le SNC [253, 254].

Pour terminer, plusieurs cytokines ont été dosées dans le sérum et/ou dans les surnageants de culture de cellules cultivées *in vitro*. Les concentrations dans le sérum restent très faibles, quel que soit le modèle étudié (**Tableau 9**), ce qui est probablement dû au fait que les animaux n'ont pas été immunisés ni infectés. Aucune modification n'a été observée après la suspension, par contre, après hypergravité à 2G ou 3G et CUMS, une diminution des cytokines Th1 (IL-2, IL-12, IFN γ) a été mise en évidence, comme cela a souvent été décrit chez les astronautes en vol [116]. De plus, après 21 jours de CUMS, les cellules spléniques sécrètent moins de

cytokines pro-inflammatoires, ce qui n'a pas pu être démontré pour le modèle de suspension ni d'hypergravité. L'inversion de la balance Th1/Th2 a été observée autant chez les astronautes que chez des individus stressés de façon chronique [116, 168]. Cependant, il reste à confirmer que les cytokines de type Th2, telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, sont augmentées après stimulation *in vitro* des splénocytes chez des souris centrifugées ou après stimulation *in vivo* des modèles animaux étudiés ici. Comme le système immunitaire communique avec le SNC, par l'intermédiaire entre autres de cytokines pro-inflammatoires, nous avons aussi dosé les transcrits de gènes codant ces cytokines, l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α , dans le système immunitaire et dans le cerveau pour compléter ces résultats. Ces derniers sont significativement diminués dans l'hippocampe des souris soumises au CUMS. La diminution de l'IL-6 est également observée dans les splénocytes de la rate. Ces résultats sont surprenants, car il a été reporté dans plusieurs études que les stress chroniques légers (CMS) entraînaient plutôt une augmentation des cytokines pro-inflammatoires [238–240]. La combinaison de stress chroniques ultra légers induit donc ici un effet anti-inflammatoire, tout comme l'hypergravité ou un séjour dans l'espace [81, 209]. Une fois encore, nos données soulignent l'importance de la nature des facteurs stressants, de leur intensité et de leur durée sur l'impact qu'ils ont sur l'organisme, notamment sur le système immunitaire. Cependant, l'analyse globale de nos données sur les cytokines reste délicate, car elles n'ont pas été réalisées avec les mêmes techniques de dosage d'une part, et les fortes variations inter-individuelles nécessitent de compléter les effectifs. Le dosage de l'IL-10 principalement sécrétée par les Trég, associé à l'analyse par cytométrie en flux de la population de Trég, serait également intéressant pour compléter l'ensemble de nos données. En effet, ces lymphocytes sont très impliqués dans l'immuno-modulation. Par ailleurs, l'évaluation de la concentration en ostéopontine dans le sang et les surnageants de culture, molécule considérée comme une cytokine pro-inflammatoire et sécrétée aussi par les LTh activés [255], pourrait conforter nos observations.

En résumé, les modèles gravitaires ont mis en évidence une diminution de la quantité des LB et de leur réponse aux mitogènes au LPS dès les premiers jours. Par contre, des stress chroniques ultra légers n'ont pas cet impact, seule la concentration en IgA est plus élevée. En revanche, la modification de la balance des cytokines de type Th1/Th2 est observée avec le CUMS, comme avec l'hypergravité (surtout à 3G), et démontre une diminution des cytokines de type Th1 et pro-inflammatoires. Quoiqu'il en soit cette baisse de la réponse Th1 est cohérente avec la réduction de la réponse des B au LPS, qui est un puissant stimulateur de la réponse inflammatoire *in vivo*, observée chez les souris soumises à une modification de la gravité. La

modification de la gravité pourrait alors être la principale cause de l'affaiblissement de l'immunité adaptative cytotoxique, en particulier des LB, observé chez les astronautes. D'ailleurs, lorsque l'équipe a exposé sur Terre des embryons de *P. waltl* aux différents stress rencontrés lors d'une mission spatiale, elle a montré que seules l'hypergravité et la micropesanteur affectaient l'expression des IgM [121], confirmant les données obtenues chez la souris. Les autres stress étudiés séparément n'ont pas eu d'impact. Il serait intéressant d'analyser la réponse des LB après stimulation par le BCR ou encore par le CD40. En effet, cela permettrait d'évaluer, d'une part, la capacité des LB à répondre à un antigène T-dépendant et, d'autre part, celle des LT à stimuler ces cellules par le biais de la sécrétion de cytokines de type Th2. Dans l'ensemble, nos résultats sont proches de ceux obtenus avec les études réalisées chez l'Homme en vol ou avec le modèle de bed-rest, l'équivalent de la suspension anti-orthostatique. La susceptibilité accrue aux infections bactériennes intracellulaires et virales des astronautes pourrait donc s'expliquer par l'ensemble des données recueillies dans ces expériences.

Intérêt sociétal et contremesures

Ce projet participe à une meilleure connaissance de données qui seront utiles pour le développement ou l'amélioration de moyens thérapeutiques afin de réduire l'incidence de ces stress sur l'immunité et ainsi éviter le développement de pathologies plus graves aussi bien chez les astronautes que chez les personnes âgées ou soumises à différents types de stress chroniques sur Terre.

En effet, plusieurs changements immunologiques observés chez les astronautes sont proches de ceux associés au vieillissement, tels que la diminution des réponses anticorps et des lymphocytes T, des fonctions cellulaires cytotoxiques, de la phagocytose et de la lymphopoïèse [42, 76–78]. Les vols spatiaux induisent également de l'ostéoporose et une réduction de la masse musculaire, comme lors du vieillissement. Les modifications induites par la suspension présentent de nombreuses similitudes avec les changements observés chez les souris âgées, à la fois en ce qui concerne l'architecture de l'os trabéculaire et les changements cellulaires et moléculaires. Ce modèle qui entraîne un vieillissement accéléré au niveau des os est donc pertinent pour étudier les mécanismes moléculaires et les conséquences des changements de la lymphopoïèse B chez la souris. Cela permettra également, à l'avenir, de développer ou d'améliorer des moyens thérapeutiques pour réduire l'incidence du vieillissement, mais aussi de l'immobilisation ou l'alitement prolongé pour raisons médicales, qui induisent aussi une ostéoporose.

Par ailleurs, certaines altérations du système immunitaire mises en évidence chez les astronautes comme avec des modèles animaux sur Terre se retrouvent également chez les personnes soumises à des stress chroniques. La diminution de cytokines de type Th1 est une des principales modifications qui pourrait engendrer de lourdes conséquences sur la santé, avec une baisse des réponses cytotoxiques vis-à-vis de cellules infectées ou tumorales par exemple. C'est pourquoi ces données peuvent aussi participer à l'amélioration et au développement de moyens pharmacologiques ou nutritionnels permettant de réduire l'incidence de ces stress sur l'organisme et ainsi d'éviter le développement de pathologies plus graves, aussi bien chez les astronautes que chez les personnes en état de stress. Il est donc nécessaire de développer des stratégies pour contrer ces effets délétères. Bien que les mécanismes précis responsables de cette immunosuppression ne soient pas encore clairement identifiés, de nombreux travaux se

sont déjà intéressés à les contrecarrer. Plusieurs pistes pharmacologiques ont été explorées et certaines semblent améliorer les fonctions immunitaires.

Tout d'abord, les nucléotides sont capables de moduler le système immunitaire en favorisant la maturation, l'activation et la prolifération des lymphocytes et la synthèse des immunoglobulines, mais également en augmentant la phagocytose des macrophages [256–258]. L'ajout d'uridine ou d'un cocktail nucléosides-nucléotides dans le milieu de culture compense la baisse de la réponse *in vitro* à un mitogène de splénocytes soumis à la micropesanteur et induit l'augmentation de la synthèse d'IL-1 β , d'IL-2 et d'IFN γ [259, 260]. Ces résultats ont également été obtenus avec des études *in vivo* chez des souris soumises à une suspension [166, 260]. 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.

Ensuite, un extrait de basidiomycètes, l'Active Hexose Correlated Compound (AHCC) contenant majoritairement des polysaccharides et des acides aminés, protège les thymocytes de l'apoptose induite par la dexaméthasone, augmente la résistance à l'infection par le virus de la grippe, augmente l'activité des cellules NK, la réponse immunitaire de l'hôte contre le virus du Nil Occidental et également la production d'IL-12 [261–264]. Ce composé a été utilisé sur des souris infectées par la bactérie *Klebsiella pneumoniae*, ce qui a entraîné une augmentation des IgG contre l'antigène et une augmentation de la production des cytokines de type Th1 [265]. Ainsi, cet extrait de champignon est un bon protecteur de l'organisme contre les infections bactériennes.

Une autre molécule, la déhydroépiandrostérone (DHEA), une hormone synthétisée par les cellules du cortex de la glande surrénale lors d'un stress [266] possède des propriétés immunomodulatrices et des effets anti-glucocorticoïdes. Elle entraîne une augmentation de la résistance aux infections bactériennes et virales [267] et favorise l'activité des granulocytes neutrophiles [268]. La DHEA, en diminuant la production de glucocorticoïdes, pourrait limiter les effets délétères du stress sur le système immunitaire.

D'autre part, la leptine, initialement identifiée comme étant l'hormone anti-obésité, agit sur de nombreuses fonctions vitales [269]. Ses effets sur l'os résultent de la balance entre une voie centrale et inhibitrice agissant par le biais de l'hypothalamus, et une voie périphérique et stimulatrice agissant directement par sa liaison sur des récepteurs spécifiques exprimés par les cellules ostéoblastiques [270, 271]. De plus, sa concentration varie beaucoup suivant différents paramètres tels que le métabolisme énergétique ou l'état nutritionnel, rendant son utilisation

délicate. Certaines observations cliniques suggèrent l'importance d'un seuil critique qui pourrait cependant rendre l'action de la leptine plus centrale que périphérique [272]. Son administration à faible dose à des rats soumis à la suspension anti-orthostatique a permis de limiter la perte osseuse [151]. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont montré son rôle stimulateur sur l'hématopoïèse et sur l'activation des LT chez le rat et chez l'Homme [154, 273, 274]. Plus récemment, des résultats encourageants ont été obtenus avec de la leptine recombinante chez l'Homme [275] et permettent d'envisager la leptine recombinante dans le traitement de l'ostéoporose ou d'une perte de masse osseuse lors de missions spatiales de longue durée.

Il existe également de nombreux anti-oxydants, molécules capables de contrer l'action néfaste d'oxydants comme les radicaux libres. Le resvératrol est un polyphénol naturel anti-oxydant [276, 277] produit par certaines plantes en réponse à une infection ou à un stress [278, 279]. Chez les mammifères, il préserve notamment la densité osseuse et induit une diminution de l'inflammation chez des souris âgées [280]. Chez le lémurien, il entraîne une diminution de la prise alimentaire concomitante avec l'augmentation de la dépense énergétique minimale nécessaire à la survie de l'organisme [281].

Le lycopène est un pigment rouge liposoluble présent dans de nombreux fruits et légumes, notamment dans la tomate. Des travaux récents ont montré qu'il induit une réduction du stress oxydatif et de l'ostéoporose [282]. Cependant, ce composé inhibe la prolifération *in vitro* de lymphocytes T du sang périphérique humain [283]. Il convient donc d'approfondir ses actions sur l'ensemble de l'organisme avant d'envisager de l'utiliser chez l'Homme.

L'épigallocatechine, molécule isolée du thé vert, a la capacité de neutraliser les radicaux libres impliqués dans le vieillissement et les maladies chroniques dégénératives. Elle augmente *in vitro* l'activité des cellules NK, la prolifération des splénocytes et la sécrétion d'IL-2 et d'IFN γ [284]. Elle a également un effet anti-inflammatoire en inhibant les voies MyD88-dépendante et -indépendante du TLR-4 [285].

L'acide chicorique est un anti-oxydant [286] provenant de l'endive. Il restaure la réponse immunitaire et l'homéostasie Th1/Th2 en augmentant la prolifération des lymphocytes T de souris stressées et en stimulant la sécrétion d'IL-12, d'IFN γ et d'IL-2 tout en diminuant celle de l'IL-10 [287]. Il serait donc intéressant d'utiliser cette molécule d'origine végétale pour contrecarrer les effets négatifs d'un séjour dans l'espace, ou chez les personnes en état de stress chronique.

Les différents composés cités ci-dessus sont de bons candidats pour limiter l'altération du système immunitaire ou restaurer ses fonctions lors d'un vol spatial et pourront être étudiés avec les modèles animaux utilisés dans ce travail de recherche mais aussi lors d'expériences de bed-rest. Ce modèle de micropesanteur simulée chez l'Homme, pour lequel l'individu est couché sur un lit incliné à -6° la tête vers le bas, a permis de mettre en évidence une augmentation de la génération de radicaux libres par les granulocytes [288], une altération de la production de cytokines [289], une perte osseuse [290] et une diminution des réponses lymphocytaires [291]. Ainsi, une étude de bed-rest prolongé, prévue fin 2015 avec des volontaires masculins, va nous permettre d'étudier entre autres la lymphopoïèse B et la création du répertoire de récepteurs d'antigènes des cellules B. De plus, nous évaluerons l'efficacité de substances anti-inflammatoires et anti-oxydantes au cours de cette expérience. Les molécules choisies pour ce projet sont le resvératrol, le lycopène, l'épigallocatechine et les vitamines E et C. Les travaux présentés dans cette thèse ont servi de base pour ce projet récemment accepté par l'Agence Spatiale Européenne.

CHAPITRE 6 : PUBLICATIONS

Publication n°1 : PLoS ONE, 2014

Three Weeks of Murine Hindlimb Unloading Induces Shifts from B to T and from Th to Tc Splenic Lymphocytes in Absence of Stress and Differentially Reduces Cell-Specific Mitogenic Responses

Fanny Gaignier¹, Véronique Schenten¹, Marcelo De Carvalho Bittencourt², Guillemette Gauquelin-Koch³, Jean-Pol Frippiat¹*, Christine Legrand-Frossi^{1*}✉

1 Stress Immunity Pathogens Laboratory, EA7300, Lorraine University, Vandœuvre-lès-Nancy, France, **2** Research Center for Automatic Control of Nancy, UMR7039, Lorraine University, Vandœuvre-lès-Nancy, France, **3** French National Space Agency, Paris, France

Abstract

Extended space missions are known to induce stress and immune dysregulation. Hindlimb unloading is a ground-based model used to reproduce most spaceflight conditions. The aim of this study was to better characterize the consequences of prolonged exposure to hindlimb unloading on murine splenic lymphocyte sub-populations. To ensure that the observed changes were not due to tail restraint but to the antiorthostatic position, three groups of mice were used: control (C), orthostatic restrained (R) and hindlimb unloaded (HU). After 21 days of exposure, no difference in serum corticosterone levels nor in thymus and spleen weights were observed between HU mice and their counterparts, revealing a low state of stress. Interestingly, flow cytometric analyses showed that B cells were drastically reduced in HU mouse spleens by 59% and, while the T cells number did not change, the Th/Tc ratio was decreased. Finally, the use of a fluorescent dye monitoring lymphoproliferation demonstrated that lymphocyte response to mitogen was reduced in Th and Tc populations and to a greater extent in B cells. Thus, we showed for the first time that, even if restraint has its own effects on the animals and their splenic lymphocytes, the prolonged antiorthostatic position leads, despite the absence of stress, to an inversion of the B/T ratio in the spleen. Furthermore, the lymphoproliferative response was impaired with a strong impact on B cells. Altogether, these results suggest that B cells are more affected by hindlimb unloading than T cells which may explain the high susceptibility to pathogens, such as gram-negative bacteria, described in animal models and astronauts.

Citation: Gaignier F, Schenten V, De Carvalho Bittencourt M, Gauquelin-Koch G, Frippiat J-P, et al. (2014) Three Weeks of Murine Hindlimb Unloading Induces Shifts from B to T and from Th to Tc Splenic Lymphocytes in Absence of Stress and Differentially Reduces Cell-Specific Mitogenic Responses. PLoS ONE 9(3): e92664. doi:10.1371/journal.pone.0092664

Editor: Jason R. Lees, Uniform Services University of the Health Sciences, United States of America

Received: October 18, 2013; **Accepted:** February 24, 2014; **Published:** March 24, 2014

Copyright: © 2014 Gaignier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the French National Space Agency (CNES), the National Research Agency (ANR), the French Ministry of Higher Education and Research, the Région Lorraine and the Lorraine-University. V.S. was supported by a CNES post-doctoral fellowship. F.G. was supported by CNES and the Région Lorraine. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: christine.frossi@univ-lorraine.fr

✉ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Human presence is currently expanding into low Earth orbit and beyond, with the ability to visit space for longer periods of time in the International Space Station and planned missions to Mars. During spaceflight, crewmembers are exposed to various environmental changes, such as confinement, anxiety, microgravity, biomechanical stresses, radiation, disruption of the circadian rhythm and new microbial environments. There have been a large number of studies to understand how this extreme environment affects various physiological functions, especially the immune system [1,2]. Researchers have demonstrated alterations in innate and specific immunity caused by spaceflight conditions [3,4], including thymic involution [5], inhibited lymphocyte blastogenesis [6,7], modification of leukocyte distribution [8,9] and cytokine production [10]. Moreover, Crucian et al. [11] have recently indicated that this immune dysregulation may depend on mission characteristics such as duration. This was especially true for

antibody production, which was not changed during short-term spaceflight [12], while long-term missions showed more severe effects [13,14]. Furthermore, our previous studies have demonstrated that long-term missions affect immunoglobulin gene expression [15–17] and antibody somatic hypermutation frequency [18,19]. Consequently, before undertaking prolonged space missions, it is important to determine which mechanisms are involved in the spaceflight-induced changes in humoral immunity, which up to now have rarely been investigated.

Due to the limited opportunities to perform space experiments and the reduced number of animals that can be involved in such experiments, it is important to have a ground-based model that reliably mimics the effects of spaceflight. This is why hindlimb unloading was developed. Hindlimb unloading of rodents is a well-accepted ground-based model used to simulate some of the conditions of spaceflight and reproduce its deleterious effects on the musculoskeletal, cardiovascular and immune systems [20–22].

This model involves suspending rodents by the tail with a head-down tilt of approximately 25°, which contributes to muscle and bone loss in the hind limbs associated with a fluid shift to the head similar to the changes observed during space missions [23–26]. The fluid shift observed in both cases affects the cellular composition of the lymphoid organs and the lymphocyte mitogenic response [27], resulting in a decreased resistance to infections [28]. Studies using this model have also shown complex contradictory observations likely due to differences in animal species, duration, choice of control group, environmental parameters and unloading technique [29]. Most of the experiments were of short duration, between 2 and 10 days [30–32], using rats as model. Therefore, it is essential to optimize the suspension conditions in order to compare with spaceflight data. First, as Morey-Holton and Globus [29] have advised, to ensure that the observed changes are not due to tail restraint but to the antiorthostatic position, a restrained control group was added to the control and hindlimb unloaded groups in our experiments. In the restrained group, mice were tail-attached, but the four limbs were allowed to have full contact with the floor of the suspension cage. Secondly, to minimize the contribution of stress to changes in specific immunity in both groups restrained by the tail, we have optimized the Wronsky-Morey-Holton system [25]. This system consists of a wire hooked on a swivel-pulley which allows 360° movement and grooming. Moreover, thymus involution, corticosterone level and body weight were used as indicators of stress. Indeed, studies by Choukèr and others [33] have thoroughly connected physiological stress to changes in specific immune parameters associated with altered gravity. It is also well known that stress hormones significantly influence lymphocyte responsiveness, but whether suspension causes a systemic stress response in mice is less well resolved than for rats. We have recently shown that B cell proliferation is greatly impaired in mice exposed to 21 days of centrifugation without a stress response [34]. In several experiments, the dramatic reduction of splenocytes associated with their depressed proliferative response has been reported [30,35], whereas the change of the B/T cell ratio and the role of stress has not been discerned. Furthermore, these studies have used traditional *in vitro* methods that take a snapshot of the number of dividing cells by pulsing with tritiated thymidine or measuring the total cell number indirectly [30,36,37]. These methods provide information about the broad effects on proliferation but give no deep insight into how the proliferative response is altered. Lyons et al. [38] developed a powerful technique using an intracellular fluorescent label, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), to analyze the division history of different immunophenotypically defined subpopulations of lymphocytes. The use of CFSE to measure up to eight successive cell divisions by flow cytometry, distinguishing proliferating and non-proliferating populations, has had a great impact on immunological studies.

To better characterize the impact of microgravity on specific immunity, we investigated the effects of long-term exposure to hindlimb unloading in the widely used inbred mouse strain C57Bl/6. The first aim of this study was to determine if restraint was an experimental parameter that had its own influence on immunological parameters. For this purpose, three experimental groups of mice were used: control, restrained and hindlimb unloaded. The second aim was to determine whether the effects of antiorthostatic suspension on the immune system can be studied apart from the effects of the stress response. Thus, thymus and spleen weights and serum corticosterone concentrations were measured. The third aim was to assess the different lymphocyte sub-populations in the spleen and their mitogenic response *in vitro*. For that purpose, we used cell staining markers, fluorescent

antibodies to identify lymphocyte phenotypes and CFSE to quantify divided cells. Finally, cytokine secretion was quantified after *in vitro* stimulation.

Materials and Methods

Ethics statement

All manipulations with animals were carried out in accordance to the National Legislation and the Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (2010/63/UE). This protocol has been approved by the regional ethic committee: Comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale – Comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale: Nancy - Lorraine - Nord-Est (number agreement: CELMEA-2012-0008).

Animals

Experiments were conducted on eight-week-old C57Bl/6N-Crl male mice of a mean body weight of 20 g purchased from Charles River Laboratories (France). Animals were housed in vented animal cabinet (Noroit, Bouaye, France) under controlled temperature and a 12 h:12 h dark/light cycle with food and water *ad libitum*. They were allowed to rest in groups of four mice in standard cages (35 cm deep × 15 cm wide × 14 cm high) for one week following arrival before being isolated in a random way for the experiments.

Hindlimb unloading

Mice were isolated five days before the beginning of the experiments in standard or specific cages. Each group consisted of 4 to 6 mice for each experiment. The control group (C) was housed in standard cages (35 cm deep × 15 cm wide × 14 cm high) while hindlimb unloaded (HU) and restrained (R) groups were housed in cages manufactured according to Chapes et al. [27] (35 cm deep × 15 cm wide × 26 cm high). Mice were suspended by using a dressing retention sheet wrapped around the tail and a wire hooked on a swivel-pulley system. To prevent mice from chewing, a small plastic tube was fixed onto the traction tape with small strips of medical paper tape. The swivel pulley glides along two stainless steel rods that run the length of the cage, which provides a full 360° range of movement. The angle of suspension for HU mice was adjusted to 25–30° such that only the forelimbs touch the grid at the bottom of the cage. Orthostatic restrained mice were not suspended, so all limbs were in contact with the grid. Throughout the 21 days of experimentation, mice were weighed daily during the first four days, then every two days thereafter. All experiments were repeated at least three times.

Sample collection

On day 21, mice were weighed and then euthanized by decapitation. Trunk blood was collected and allowed to clot at ambient temperature for 15 min. Serum was collected after a centrifugation at 2000 g at 4°C for 15 min and stored at –80°C before corticosterone and cytokine quantification. The thymus and spleen of each animal were removed and weighed. The spleen was placed immediately into sterile tubes containing 3 ml of RPMI 1640 medium (PAA, Pashing, Austria) to perform lymphocyte assays.

Lymphocyte populations

The spleen was dissociated into RPMI 1640 medium. Red blood cells were lysed with NH₄Cl 140 mM (eBioscience, San Diego, CA, USA) before counting nucleated cells using a hemocytometer. To evaluate lymphocyte sub-populations, 10⁶

splenic cells were incubated for 15 min at 4°C in the dark with a mixture of four anti-mouse fluorescence-labeled monoclonal antibodies: ECD anti-CD19 (clone 6D5, Beckman Coulter, Marseille, France), APC anti-CD3ε (clone 17A2, eBioscience), PE anti-CD4 (clone RM4-5, eBioscience) and PE-Cy7 anti-CD8α (clone 53-6.7, eBioscience). Immunophenotyping was carried out using a five-color FC500 flow cytometer (Beckman Coulter). A first gate was applied to select the lymphocyte population using a window with forward scatter (FSC) and side scatter (SSC). Fifty thousand events in the viable lymphocyte gate were acquired. Data were analyzed using FlowJo software v7.6.5 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) to identify specific lymphocyte sub-populations: CD19⁺ B cells, CD3⁺ T cells, CD3⁺CD8⁺ cytotoxic T cells (Tc) and CD3⁺CD4⁺ helper cells T (Th). Populations are expressed as percentages of the total lymphocyte population.

Lymphoproliferation measurement

To evaluate lymphocyte proliferative responses, 20×10^6 splenic cells were suspended in 1 ml of Phosphate Buffer Saline (PAA) supplemented with 1% heated fetal calf serum (FCS, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). CFSE (Life Technologies, Paisley, UK) was added to a final concentration of 5 μM in DMSO (dimethyl sulfoxide) and the suspension was incubated at 37°C for 8 min. The staining was quenched with 2 ml of ice-cold FCS and incubated for 5 min at 4°C. Cells were collected by centrifugation and washed in culture medium, RPMI 1640 medium supplemented with 10% heated FCS, 100 U penicillin, 100 μg/ml streptomycin and 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich). Finally, cells were adjusted to 10×10^6 /ml in culture medium. Two mitogens, lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) and concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich), were used to stimulate lymphocytes. Cells were dispensed in 50 μl triplicates into the wells of a 96-well round-bottom tissue culture plate containing 50 μl of culture medium without (unstimulated cells) or with mitogen (stimulated cells) at a final concentration of 5 μg/ml. The plate was incubated for 72 h at 37°C and 5% CO₂. After 72 h, cells from each well were washed in PBS before being incubated with the mixture of fluorescent antibodies used for phenotyping. The supernatants from each well were frozen at -80°C until cytokine quantification. All fluorochrome-stained lymphocyte cultures were analyzed by five-color analysis using the FC500 flow cytometer. The lymphocyte gate was based on light scatter parameters, cell size and internal granularity. Thus, the gate was placed on the population that represented the viable lymphocytes plus the blast cells, which are generally low on side scatter. Within this gate, 50,000 events were acquired and the proportions of each cell type (CD19⁺ B cells, CD3⁺ T cells, CD3⁺CD4⁺ helper T cells (Th), CD3⁺CD8⁺ cytotoxic T cells (Tc)) were determined using FlowJo software v7.6.5. To calculate the percentages of increase of each lymphocyte sub-population in response to mitogen stimulation, the following formula was used: [(% population stimulated - % population unstimulated)/% population unstimulated]. The fluorescence of CFSE staining was measured to determine the proportion of divided cells among total lymphocytes or cell subsets focusing on CD19⁺ cells after stimulation with LPS or on CD3⁺CD8⁺ and CD4⁺ cells after stimulation with ConA. The FlowJo software determines generation 0, meaning the cells with 100% of max CFSE, and calculates the percentage of divided cells from this, using the number of events and CFSE fluorescence.

Corticosterone assay

The corticosterone concentration was measured without any extraction procedure using a commercial ELISA kit according to

the manufacturer's instructions (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA). The concentration of corticosterone in serum samples was calculated using a 4-parameter curve and expressed in ng/ml. The intra- and inter-assay coefficients of variation were under 8.4% and 13.1%, respectively.

Cytokines analysis

Mouse sera and culture supernatants were thawed immediately before analysis. Cytokines were quantified using the Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Kit (eBioscience) according to the manufacturer's instructions using the FC500 flow cytometer. The concentration of each cytokine was calculated using the FlowCytomix Software (eBioscience) and expressed in pg/ml. The limits of detection of each analyte were: GM-CSF 10.9 pg/ml, IFN-γ 6.5 pg/ml, IL-1α 15.7 pg/ml, IL-2 8.8 pg/ml, IL-4 0.7 pg/ml, IL-6 2.2 pg/ml, IL-5 4.0 pg/ml, IL-10 5.4 pg/ml, IL-17 2.4 pg/ml and TNF-α 2.1 pg/ml.

Statistics

SPSS v13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) was used to perform statistical analyses. Outlier values were determined by a boxplot of each group studied. Once normality and homogeneity of variances were assessed as determined by Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, an ANOVA was performed and a Tukey post-hoc test was used to establish inter-group comparisons (C, R and HU). When the data were not normally distributed, a Kruskal-Wallis non parametric test was performed and a Dunnett T3 post-hoc test was used for inter-group comparisons. To indicate significance and trend, p-values of <0.05 and <0.10 were selected, respectively. All data are presented as the means with standard error of the mean (SEM).

Results

Body weight

Because differences in body weight between the HU and C groups can influence the interpretation of the experimental results, we recorded the weights of the mice during the 21 days of experimentation. The C mice grew regularly while both R and HU mice exhibited a significant drop in body weight during the first three days, but no further decrease was observed over the next days (Fig. 1). R mice recovered their initial weight on day 8, whereas HU mice returned to their initial weight on day 15. The mean body weight for the HU group was significantly lower on day 19 ($p=0.035$) than that observed in the C group, and a tendency toward decreased weight ($p=0.068$) was observed on day 21. Inter-individual variability, revealed by standard error bars, was large but similar for all groups. This is most likely due to the young age of the mice, because their weight was not yet constant. Two peaks of increase were observed at days 8 and 15 for the R and HU groups. These peaks were concomitant with litter cleaning at days 7 and 14 coupled with the refilling of food and water. At the end of the experiment, body weight gain was not significantly different ($p=0.263$) for the R and C mice, which gained an average of 1.5 g and 2.4 g, respectively (Table 1). A significant difference appeared when HU mice were compared to R and C mice (*versus* R: $p=0.032$; *versus* C: $p=0.002$), as they did not gain weight, while the other groups grew by approximately 7% (R) and 11% (C) in comparison to their initial weights.

Lymphoid organs

To assess the stress and immunological status of the mice at the end of the experiments, we measured the thymus and spleen weights and normalized these values to body weights (Table 1). No

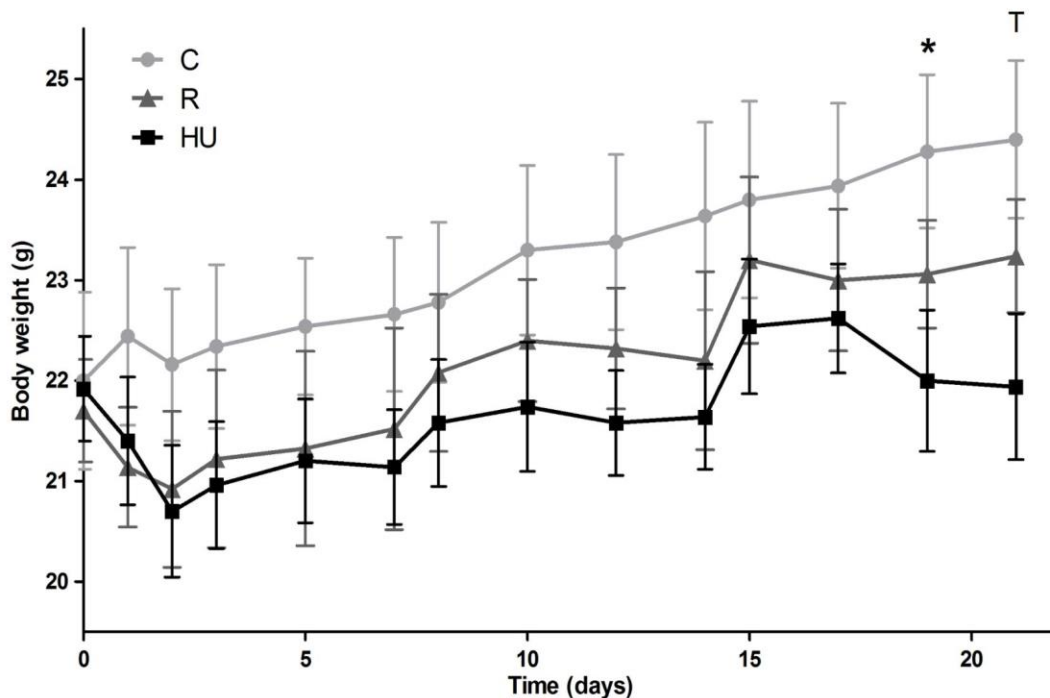


Figure 1. Body weight evolution in control (C), restrained (R) and hindlimb unloaded (HU) mice. Mice of each group were weighed daily for the first four days and then every two days. Every seven days, cages were cleaned and feeders and bottles were refilled with food and water. Weights are presented with SEM for each condition of housing. Each experimental group was compared to the others. $n=5$ mice per group. Differences were found to be statistically significant using ANOVA and a Tukey *post-hoc* test. * $p=0.035$ HU versus C by day 19; ^T $p=0.068$ HU versus C by day 21.

doi:10.1371/journal.pone.0092664.g001

significant difference appeared between the normalized spleen weights of the three groups of mice. The number of nucleated cells in the spleen was reduced in the R and HU mice by 19% and 25%, respectively, although these differences were not statistically significant (*versus* R: $p=0.479$; *versus* HU: $p=0.273$) (Table 1). Although a slight decrease was observed in the normalized thymus weight in the R and HU mice, it was not significant when compared with the C group ($F=0.742$, $p=0.497$). Notably, the same trend was observed in all previous suspension experiments we have performed.

Serum corticosterone concentration

To evaluate the stress response, we measured the concentration of corticosterone in the serum of each mouse in addition to measuring the weight of the thymus. After 21 days of experimentation, there was no difference between the corticosterone concentrations of the three groups (Fig. 2). All of the concentrations were below 50 ng/ml, suggesting that the mice were adapted to the orthostatic or antiorthostatic conditions. Again, it is noteworthy that the same trend was observed in all previous suspension experiments we performed.

Splenic lymphocytes populations at the end of the treatments

To determine how orthostatic and antiorthostatic restraints modify the number and the proportions of B and T cell subpopulations in the spleen, we carried out an immunophenotyping of the lymphocytes. The different sub-populations were determined within the viable lymphocyte gate (Fig. 3A). No statistically significant difference was observed between the total lymphocyte percentages for the three groups of mice which was 70.0% for C group and 64.9% and 63.8% for R and HU groups

respectively (Fig. 4A), although the number of nucleated cells was decreased by 25% for the HU group (Table 1). To determine to what degree loss or increase of total lymphocytes and each subset contribute to the percentage changes reported, the absolute numbers were calculated from the number of nucleated cells (Table 2). The number of total lymphocytes decreased in R and HU groups (25% and 33% respectively), although these decrease were not statistically significant.

To quantify the proportions of lymphocyte subpopulations, positive cells for each phenotypic marker were selected in the lymphocyte gate. CD19⁺ was used for B cells, CD3⁺ for T cells (Fig. 3B), CD3⁺/CD8⁺ for cytotoxic T cells and CD3⁺/CD4⁺ for helper T cells (Fig. 3C). This cytometric analysis was performed on mice from each of the 3 groups, and results are shown in Figure 4B. CD19⁺ B cells represent 51.2% of total lymphocytes in the spleen of C mice, compared to 39.2% and 32.6% in the spleen of R and HU mice, respectively. Thus, there is a decrease in B cells of 23% in the R group and 36% in the HU group. Both differences were statistically significant, with a greater difference in the antiorthostatic restrained mice (C *versus* R: $p=0.003$; C *versus* HU: $p<0.001$). Moreover, the absolute number of B cells was significantly decreased by 44% and 59% in R and HU groups respectively ($p=0.039$ and $p=0.011$) when the proportions were related to total lymphocytes and compared to C group (Table 2). Figure 4B shows that in the R and HU groups, the percentages of total T cells (CD3⁺) were significantly increased by 25% and 38%, respectively (C *versus* R: $p=0.011$; C *versus* HU: $p=0.001$). Even if the proportion of T cells was raised compared to B cells in R and HU groups, the absolute numbers of T cells did not change (Table 2). However, the B/T ratio dramatically decreased from 1.2 to 0.7 and 0.5 after 21 days of orthostatic and antiorthostatic restraints respectively, both in percentages and absolute numbers.

Table 1. Body weight gain, lymphoid organ normalized weight and spleen cellularity in control (C), restrained (R) and hindlimb unloaded (HU) mice at the end of the experiments.

Group	Body weight gain (g)	Normalized spleen weight (mg/g)	Normalized thymus weight (mg/g)	Number of splenic nucleated cells ($\times 10^6$)
C	+2.40 ± 0.290	3.04 ± 0.047	3.10 ± 0.327	73.9 ± 5.8
R	+1.54 ± 0.334	2.91 ± 0.212	2.66 ± 0.245	60.1 ± 10.6
HU	+0.02 $\pm 0.460^{*†}$	3.06 ± 0.208	2.74 ± 0.220	55.1 ± 7.4

C = Control, R = Restrained, HU = Hindlimb Unloaded.
* $p = 0.032$ versus R, $^{\ddagger} p = 0.002$ versus C.

Body weight gain was calculated with the formula [body weight on day 21 - body weight on day 0 of the treatment]. Normalized weights were calculated with the ratio [organ weight/body weight] for each mouse. The number of splenic nucleated cells was calculated after red blood cell lysis with NH_4Cl . Each group was compared to the others. $n = 5$ mice per group. Differences were found to be statistically significant using an ANOVA and Tukey *post-hoc* test. HU mice did not gain weight ($p = 0.032$ versus R, $p = 0.002$ versus C), while the other groups grew by approximately 7% (R) to 11% (C) in comparison to their initial weight. No significant difference was found between the three experimental groups for lymphoid organ normalized weights. The number of nucleated cells was reduced by 19% and 25%, respectively, in the R and HU mice in comparison to C mice, although these differences were not significant (versus R: $p = 0.479$; versus HU: $p = 0.273$). Data are mean values \pm SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0092664.t001

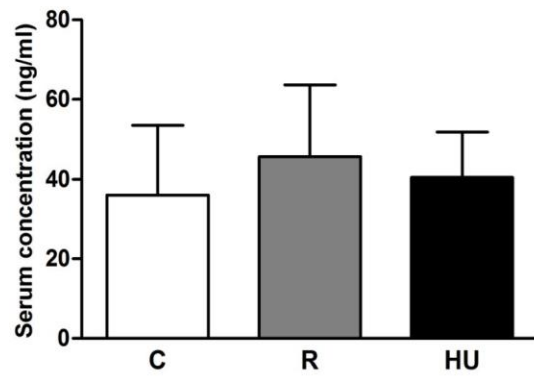


Figure 2. Serum corticosterone concentration in control (C), restrained (R) and hindlimb unloaded (HU) mice. Trunk blood was collected immediately after the sacrifice. Corticosterone concentration was measured using an ELISA kit with a detection threshold of 16.9 pg/ml. Each experimental group was compared to the others. $n = 4, 6$ and 4 mice for C, R and HU groups, respectively. No significant difference was found using an ANOVA and Tukey *post-hoc* test.
doi:10.1371/journal.pone.0092664.g002

In the spleens of the HU mice, the percentages of $\text{CD}3^+\text{CD}8^+$ and $\text{CD}3^+\text{CD}4^+$ T cells were increased by 57% ($p < 0.001$) and 26% ($p = 0.021$), respectively (Fig. 4B) but the absolute numbers of these subpopulations did not significantly vary between the 3 groups (Table 2). However, the $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ ratio was reduced for R and HU mice both in percentages and absolute numbers. This ratio was 1.5 for C mice, compared to 1.4 and 1.2 for the R and HU groups, respectively. A close inspection of the perturbations measured in the lymphocyte populations showed that hindlimb unloading significantly worsened the modifications in the lymphocyte populations observed during orthostatic restraint.

Variations of splenocytes populations 72 hours after *in vitro* stimulation

After 72 hours of *in vitro* stimulation with different mitogens, cells were analyzed by flow cytometry. Figure 5A presents an example of the analysis. First, a viable lymphocyte gate was applied to select all cells, not only those that responded to the stimulation. Indeed, granularity levels increase when cells die, so they could be excluded using SSC. Each subset was selected from the viable lymphocytes as described in Figure 3. Because the proportions of lymphocyte sub-populations were different between the three experimental groups at the end of the treatment (Fig. 4B) and after 72 h of culture without mitogen (Fig. 6), to precisely compare the mitogenic-induced blastogenesis, we calculated the percentage of increase or decrease for each cell type after 72 h of incubation using the formula described in the Materials and Methods section. These calculations were performed for each mouse of the three groups and the results are presented in Table 3.

The increase in total lymphocytes after 72 h of stimulation with LPS for both R and HU mice was lower compared to the C mice (Table 3). The increase of total lymphocyte percentage was reduced in the mice from the HU group (16.9%), compared to their control counterpart from the C group (41.6%). These differences correspond to a significant 60% reduction of the increase of the total lymphocyte percentages in HU mice compared to the C group ($p = 0.025$). For the R group, the mitogenic-induced blastogenesis was also lower than the C group but statistically non-significant. When we focused on the $\text{CD}19^+$ population, the slight decreases observed for the HU and R groups compared to the C group were not significant.

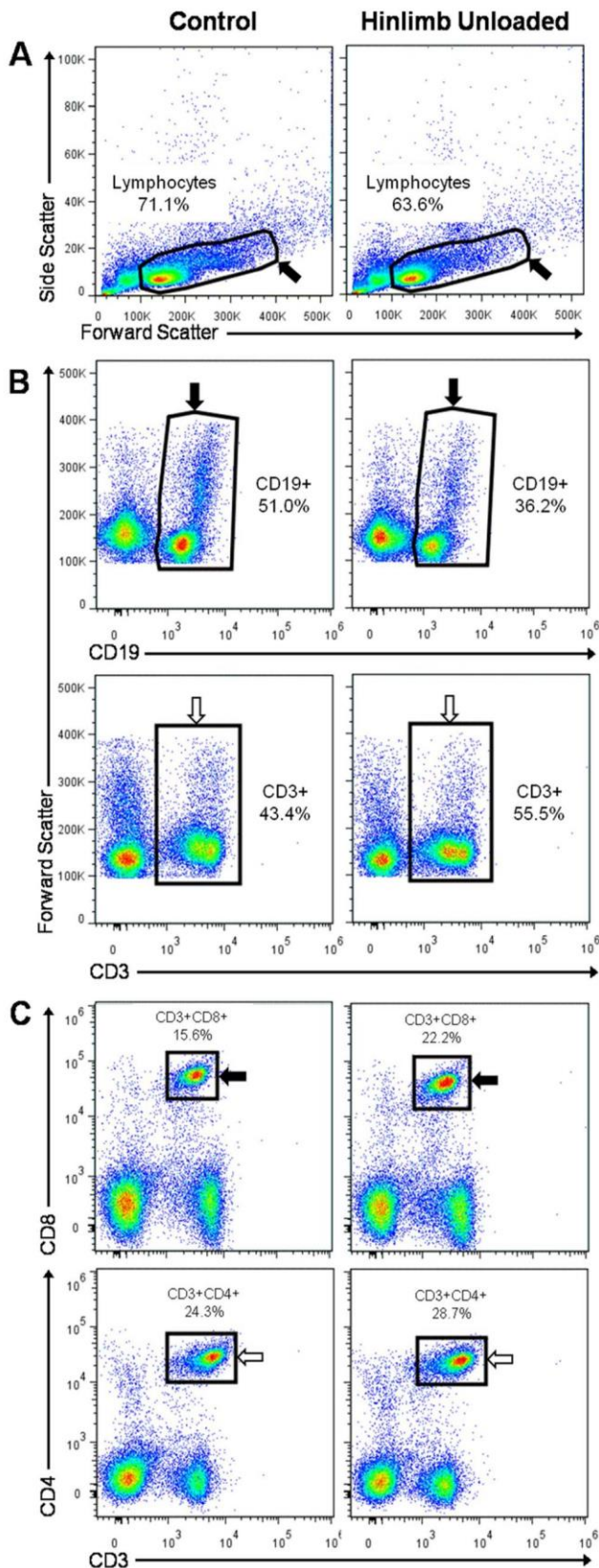


Figure 3. Representative flow cytometry density plots from splenic lymphocyte populations. Splenocytes were isolated from mice and labeled as described in the Methods section. For each mouse, the lymphocyte populations were determined as in the two examples presented here. **(A)** Splenocyte analysis by flow cytometry using FlowJo software and sorted with FSC/SSC profiles, separating viable lymphocytes (black arrow) from the other cells. **(B)** Among the lymphocyte

population, CD19⁺ B cells (black arrow) were selected in the FSC/CD19 window and CD3⁺ T cells (white arrow) were selected in the FSC/CD3 window. **(C)** Among the lymphocyte population, CD3⁺CD8⁺ T cells (black arrow) were selected in CD3/CD8 profiles and CD3⁺CD4⁺ T cells (white arrow) were selected in CD3/CD4 profiles.
doi:10.1371/journal.pone.0092664.g003

After ConA stimulation, no significant difference was observed between the three experimental groups (Table 3), even if the percentage of increase in total lymphocytes was higher for the C group (+40.0%) than for both R and HU groups (+36.3% and +29.3%, respectively). There was no difference between the C and R groups in the response of CD3⁺ cells to ConA (+73.7% and +73.0%, respectively), whereas there was a 40% decrease of CD3⁺ cell subsets (CD4 and CD8), there were differences between the C group and both restraint groups, but these were not statistically significant. The percentage of increase in CD3⁺CD8⁺ cells after stimulation was reduced by 56% for the HU mice (tendency, $p = 0.081$) and 37% for the R mice compared to C mice (Table 3). Surprisingly, the CD3⁺CD4⁺ cell population decreased by 22% in both the R and HU groups after 72 h of ConA stimulation, while for C mice almost no increase was detected (Table 3). This could be explained by an unresponsiveness of these cells to mitogen, or by their proliferation being immediately followed by death, as we can see in Figure 5A. Thus, it appears that the two T cell subpopulations, Th and Tc, were not affected in the same way by the suspension. Moreover, if we consider only the proliferative response of the total lymphocytes, we can see that the effect of the antiorthostatic position increased the negative effect of attachment. However, the results are more subtle when we look at the level of lymphocyte subsets.

Splenocytes proliferation after 72 hours of *in vitro* stimulation

To determine the extent to which the different lymphocyte subsets were affected, CFSE labeling was used to track cell proliferation profiles. In the example presented in Figure 5B, the number of generations calculated by the FlowJo software was similar between experimental groups, except for Th cells. For CD19⁺ B cells, there were only 4 generations, and many cells remained in generation 0. For CD3⁺ T cells, 7 generations were observed after 72 h of stimulation with ConA, except for the CD3⁺/CD4⁺ Th cells of HU mice. Moreover, the number of T cells in generation 0 was lower than the number of B cells in generation 0. For all of the subsets, the repartition of daughter cells between generations was different between HU and C mice.

The total number of dividing cells in each subset was calculated for each mouse. Mean values are presented in Figure 7. Data from the 3 groups of mice confirm that the percentage of dividing CD19⁺ cells in response to LPS was lower than the percentage of dividing CD3⁺ cells in response to ConA (10–15% with LPS versus 36–65% for ConA). As observed in table 3, orthostatic restraint had a slight, but not significant, effect on the proliferation of lymphocytes stimulated either with LPS or ConA. Compared to the C group, restraint induced a 5% decrease in the number of T cells (CD3⁺) that divided in response to ConA and a 12% decrease in B cells (CD19⁺) that divided in response to LPS (CD3⁺: $p = 0.907$; CD19⁺: $p = 0.213$). Note that the numbers of dividing helper and cytotoxic T cells were similar between the R and C groups ($p = 0.993$ and 0.886 , respectively).

Even if the percentage of dividing cells was low after LPS stimulation, our experiments show that HU has a negative effect on the mitogenic response of splenocyte subpopulations. Indeed, the number of dividing CD19⁺ cells after LPS stimulation was

decreased by 32% ($p=0.002$) and 40% ($p<0.001$) in HU mice when compared to the R and C groups, respectively (Fig. 7A). The number of dividing $CD3^+$ cells from HU mice was decreased by 13 and 18% when compared to the R and C groups, respectively (Fig. 7B). Moreover, each $CD3^+$ subpopulation, $CD3^+CD4^+$ and $CD3^+CD8^+$, was not affected in the same proportion. The response of cytotoxic T cells from the HU group was decreased by 14% in comparison to the C group, whereas there was a 23% reduction in helper T cells. Unfortunately, these data were not statistically significant.

Collectively, these findings indicate that hindlimb unloading by itself has a great negative impact on the *in vitro* responsiveness of splenic lymphocytes, principally targeted to the B cell population.

Cytokines secretion after 72 hours of *in vitro* stimulation

First, it should be noted that the detection threshold of the kit used to quantify cytokines in the serum of mice was not low enough to detect differences between the 3 groups of mice. Thus, unlike previous reports concerning centrifuged mice or astronauts, hindlimb unloading or restraint did not induce a detectable increase of the 10 measured cytokines in peripheral blood. Consequently, to determine whether the negative effect of restraint or hindlimb unloading on the proliferative response resulted in the differential activation of cytokine responses, secreted cytokines were measured in culture supernatants after 72 h of lymphocyte culture with LPS or ConA. Ten cytokines were measured in the supernatants of cells stimulated with LPS, but concentrations of IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5 and IL-17 were below the detection threshold (15.7, 8.8, 0.7, 4.0 and 2.4 pg/ml, respectively) of the kit. Figure 8 shows the concentrations of the other five cytokines. Whereas there were no statistically significant differences between the three groups, there were some changes between the HU and both the C and R groups, depending on the cytokine. IL-6 was slightly increased in HU mice, with no change in R mice (Fig. 8A). GM-CSF was increased two-fold in HU mice (Fig. 8B). The secretion of IFN- γ was strongly increased in HU mice, with no change between C and R mice (Fig. 8C). There were no changes

in the TNF- α and IL-10 concentrations between the C and HU mice (Fig. 8D and 8E).

Figure 9 shows the concentrations of the six cytokines that could be quantified in the culture supernatants after 72 h of stimulation with ConA. IL-1 α , IL-2, IL-4 and IL-10 concentrations (sensitivity of 5.4 pg/ml) were under the detection threshold. For the other cytokines, no significant differences were observed between the three experimental groups. Only the IL-17 concentration was two-fold lower in R mice compared to the C and HU mice (Fig. 9F), but the SEM was high and thus must be interpreted cautiously.

Discussion

Our results show that both R and HU mice lost weight during the first three days of the experiments, but they adapted quickly to the treatments, as indicated by increasing body weight starting on the fourth day (Fig. 1). The R mice gained weight in a similar manner to the C group at the end of the experiments, while the HU mice just recovered their initial weight. Other investigators have shown that HU rats also experienced a significant reduction in body weight, similar to flown rats [39–41]. This weight reduction is most likely induced by the decrease of food intake at the beginning of the suspension, as previously described by Morey-Holton and Globus [29]. This hypothesis is sustained by the observation of two small increases in body weight after the provision of new food and water on days 7 and 14 (Fig. 1). Moreover, Tsvirkun et al. [42] have observed an increase in locomotor activity during the second half of rat unloading experiments, and Momken et al. [43] have reported an increase in total energy expenditure in rats unloaded for 14 days. These observations could also account for the lower body weight of HU mice.

In this study, hindlimb unloading did not alter the normalized weights of the spleen and thymus. Our data are in agreement with Felix et al. [21], who observed no difference between the lymphoid organ weights of C and HU mice. However, Caren et al. [44] noticed splenic atrophy after 22 days of rat suspension. On the whole, the effect of gravity modification on lymphoid organ weight has been reported to be variable [40,45,46]. This could be

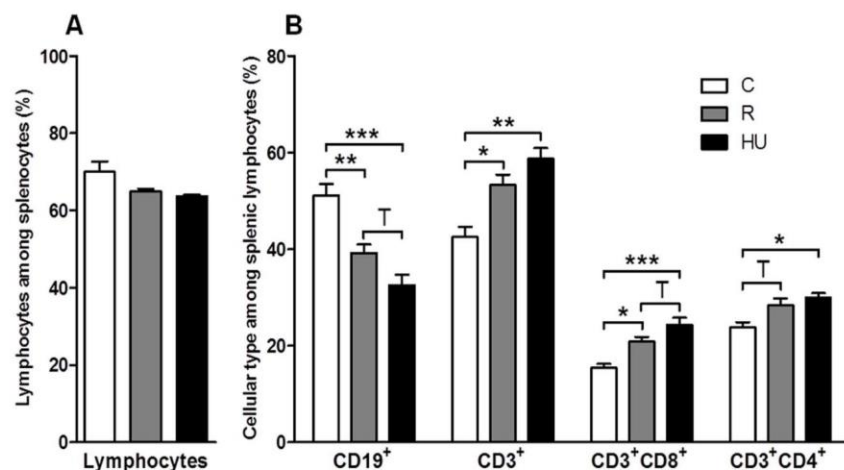


Figure 4. Phenotypes of splenic lymphocytes in control (C), restrained (R) and hindlimb unloaded (HU) mice. After incubation with fluorescent antibodies, cell populations were identified by flow cytometry. (A) Viable lymphocytes were first gated using a forward and side scatter window. (B) Populations of interest were then expressed as percentages of the lymphocyte population. Each experimental group was compared to the others. $n=4, 6$ and 4 mice for C, R and HU groups, respectively. Differences were found to be statistically significant using an ANOVA and Tukey *post-hoc* test. [†] $p<0.1$; * $p<0.05$; ** $p<0.005$; *** $p<0.001$. The comparison of HU and C groups reveals that CD19⁺ B cells are decreased by 40% ($p<0.001$) while CD3⁺ T cells are increased by 38% ($p=0.002$) in HU mice. Both CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD4⁺ subsets are significantly more abundant in HU than in C mice (by 60% and 25%, respectively).
doi:10.1371/journal.pone.0092664.g004

Table 2. Absolute numbers of lymphocytes and lymphocytes subsets in the spleen ($\times 10^5$).

Group	Lymphocytes	CD19 ⁺	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺
C	52.3 ±6.3	27.1 ±4.2	22.0 ±2.1	8.0 ±0.7	12.3 ±1.2
R	39.0 ±6.9	15.2* ±2.7	21.1 ±4.1	8.2 ±1.5	11.4 ±2.4
HU	35.1 ±6.2	11.1 [#] ±1.3	21.0 ±4.4	8.8 ±2.0	10.7 ±2.1

C = Control, R = Restrained, HU = Hindlimb Unloaded.
* $p=0.039$ versus C; [#] $p=0.011$ versus C.

Absolute numbers for each cell population was calculated using the number of splenic nucleated cells and the percentages obtained by flow cytometry. Each group was compared to the others. $n=4, 5$ and 4 mice for C, R and HU groups, respectively. Differences were found to be statistically significant using an ANOVA and Tukey *post-hoc* test. The number of total lymphocytes was reduced by 25% and 33%, respectively, in R and HU mice in comparison to C mice. There was no significant difference for T cells and their subpopulations for the three groups. The number of B cells was significantly decreased by 44% ($p=0.039$) and 59% ($p=0.011$) in R and HU mice, respectively. Data are mean values \pm SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0092664.t002

explained by the variability of experimental conditions, including the spaceflight profile, ground-based model, duration and animal model used. Furthermore, in their review, Morey-Holton and Globus [29] have thoroughly described the importance of controlling the environmental parameters and using an adapted tail traction system to maintain a low level of stress for the mice. Numerous studies have demonstrated a close correlation between elevated corticosterone concentration and the weight of lymphoid organs after hyper- or microgravity exposure [47,48]. In our experiments, the corticosterone concentration was the same in the three groups of mice (Fig. 2). It is likely that in the early days of our experiment, the concentration increased, as observed by Steffen and Musacchia [49], because both restraint and tail suspension are stressful events. Nevertheless, in our hands, the mice adapted quickly to the suspension, most likely because of the improved attachment device as well as the use of vented animal cabinets.

Despite the absence of a significant reduction in spleen mass, the total cell numbers were reduced in R and HU mice by 20% and 25%, respectively. Our data are in accordance with Wei et al. [35], who observed a decrease of approximately 50% in the splenocyte number from the second day of suspension, mediated by apoptosis and leukocyte redistribution. The same explanations likely apply in our case because the stress response generated *via* the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system (SNS) is known to provoke apoptosis, and it is also known that the head-down tilt position induces a fluid shift. Because our data show that the mice adapted quickly to the R or HU treatments, we can reasonably assume that, in our experiment, fluid shift is the major factor that affects the number of splenic cells. However, we cannot totally exclude the role of the sympathetic nervous system on the spleen, which is abundantly innervated [50]. At the beginning of the suspension, a reduction in the splenocyte number could take place following the activation of the SNS, even in the absence of elevated corticosterone at the end of the suspension, as Wei et al. [35] have suggested.

Our flow cytometry analysis revealed that lymphocyte subpopulations are modified in the spleens of R and HU mice (Fig. 4B), with a greater and more significant effect for the HU group. Thus, the head-down antiorthostatic position adds its effect to that of tail restraint. The proportion of CD19⁺ B cells decreased with a concomitant increase in CD3⁺ T cells in mice exposed to HU, and the B/T cell ratio decreased from 1.2 to 0.5 (C *vs* HU groups). The absolute number of B cells was dramatically decreased (by about 60%) in the spleen of HU mice while the absolute numbers of T cells remained unchanged. Interestingly, the CD4⁺/CD8⁺ ratio decreased from 1.6 to 1.2 (C *vs* HU). Several studies have shown changes in the subpopulations of lymphocytes in the secondary lymphoid organs after exposure to simulated microgravity or after a stay in space. The results were sometimes contradictory and organ-dependent. Sonnenfeld et al. [51] reported an increase in the percentage of splenic CD4⁺ and CD8⁺ cells in rats flown onboard Cosmos 2044 for 22 days, while Pecaut et al. [52] have reported the opposite. Gridley et al. [9] showed a decrease in B cell counts in the spleens of C57Bl/6 mice flown on STS-118, whereas another study [39] revealed the opposite for C57Bl/6 mice flown on STS-108. The discrepancy between these results is somewhat disconcerting. Pecaut et al. [39] have previously discussed these contradictory effects involving not only differences in flight or suspension conditions but also single-label flow cytometric analyses. Here, we used a 5-color flow cytometer to characterize the various phenotypes with a greater degree of accuracy. Moreover, the choice of phenotypic markers can also influence the results and consequently complicate inter-study comparisons. Our data are in agreement with O'Donnell et al. [32], who

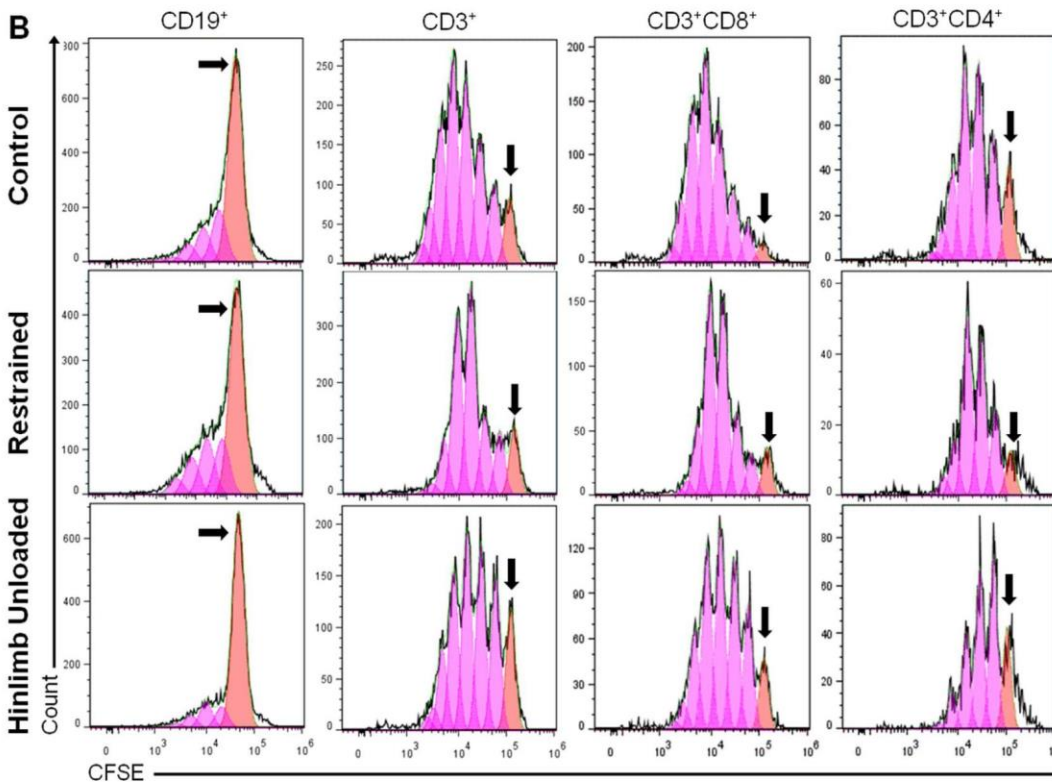
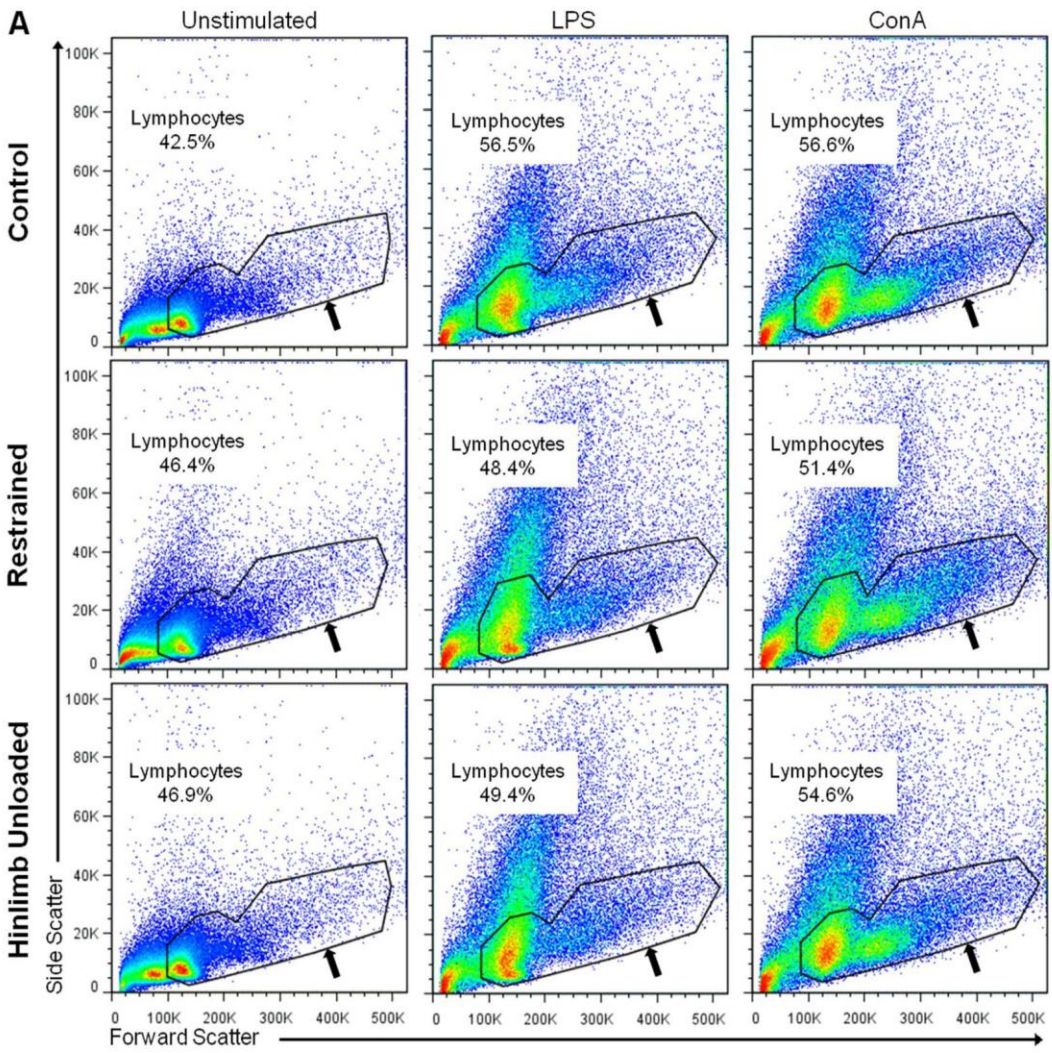


Figure 5. Detection of lymphocyte division after 72 h of *in vitro* stimulation with or without mitogen. Splenocytes were labeled with CFSE and cultured for 72 h with or without mitogen (LPS or ConA). For each mouse, dividing lymphocytes were determined as in the three examples presented here. (A) Cells were labeled with fluorescent antibodies and analyzed by flow cytometry. They were sorted by FSC/SSC profiles, separating viable lymphocytes (black arrow) from dead cells and cellular debris. (B) Among the viable lymphocyte gate, each subpopulation was selected as described in Figure 3 and assessed for fluorescent division peaks. Generation 0 (black arrow) and each of the following generations (pink area) were used by the software to calculate the number of dividing cells. doi:10.1371/journal.pone.0092664.g005

observed similar specific changes in the lymphocyte subpopulations as early as 18 h after the initiation of the hindlimb unloading procedure using the same markers. Recently, Grigorenko and Sapin [53] have shown a dramatic activation of splenocyte destruction, absence of plasma cells and suppression of lymphocytogenesis with the disappearance of mitotically dividing cells associated with a decrease in the number of blast cells in Mongolian gerbils after a 12-day-long spaceflight. Overall, the changes were most evident during the first week, with a greater change noted for cells in the spleen. Taken together, these findings indicate that the cell redistribution in the spleen takes place early in response to altered gravity exposure and persists throughout at least three weeks. Two mechanisms are possible to explain this change: a release of B cells from the spleen or a greater sensitivity of B cells to apoptosis. Wei et al. [35] found that HU-induced lymphopenia was due, at least in part, to apoptosis. Nevertheless, B and T cells were impacted in the same proportions. Thus, once again, the redistribution of cells due to changes in fluid distribution associated with the modification of adhesion molecule expression seems more likely. Further studies are needed to determine whether these modifications are associated with changes in adhesion molecule expression and/or in chemokine secretion, as shown after spaceflight [54] and hypergravity exposure [34]. Furthermore, it would be very interesting to determine which type of B cells is affected, e.g. marginal or follicular zone B cells. In any case, our findings demonstrate a shift in immunological homeostasis from the humoral branch of adaptive immunity toward cell-mediated mechanisms, as indicated by the shift from B to T cells in the spleen, especially toward cytotoxic T cells.

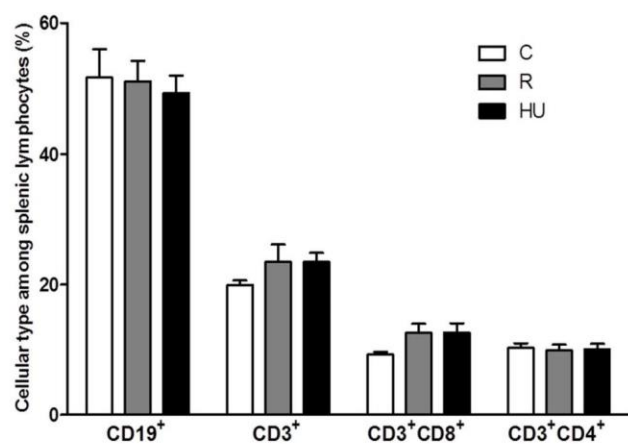


Figure 6. Phenotypes of splenic lymphocytes from control (C), restrained (R) and hindlimb unloaded (HU) mice after 72 h of incubation without mitogen. After incubation with fluorescent antibodies, cell populations were identified by flow cytometry. Lymphocytes were first gated according to their size and granularity. Populations of interest were then expressed as percentages of the lymphocyte population. Each experimental group was compared to the others. $n=5$ mice per group. No significant difference was found using an ANOVA and Tukey *post-hoc* test. doi:10.1371/journal.pone.0092664.g006

Fewer total lymphocytes divided in response to stimulation, regardless of the mitogen, for both the R and HU groups, even if this difference was only statistically significant for the HU group stimulated with LPS (+41.6% vs +16.7%, for C vs HU groups) (Table 3). Upon analysis of lymphocyte subpopulations, no difference was observed for CD19⁺ cells between the three groups after LPS stimulation. CD3⁺CD8⁺ cells were less increased after ConA stimulation in suspended mice (+139.4% for C vs +61.3% for HU). The p value obtained when the C and HU groups were compared was 0.081, likely because of the high inter-individual variability. CD3⁺CD4⁺ cells were not increased in C mice and were even reduced in both the R and HU groups after stimulation (-2% for C vs -22% for HU and R). It should be noticed that, in these *in vitro* stimulation studies, we focused on the proportion of the different cell subsets without taking into account absolute cell numbers. Thus, observed variations in percentages of cell subsets cannot exclude the possibility that a loss or an increase of cell survival during the 3 days of culture could impact our interpretation. Nevertheless, our findings are comparable with early studies of rodents exposed to suspension or spaceflight [30,39,46,55]. However, in these studies, the duration of total lymphocyte stimulation was shorter, and the authors used traditional *in vitro* methods such as tritiated thymidine to measure proliferation. These methods provide general information about the broad effects on proliferation, but give no deep insight into how the proliferative response is altered.

To better understand these proliferation results, we calculated the percentages of dividing cells in each sub-population. A dramatic decrease of approximately 40% was noted for CD19⁺ B cells (Fig. 7A). These results clearly demonstrate that the antiorthostatic position has effects beyond those of orthostatic restraint, not only on the proportion of B cells in the spleen but also on their mitogenic response. These decreases in splenic B cell number and proliferative response could greatly impair organism defenses against Gram-negative bacteria, as revealed by the studies of Sonnenfeld's team [28,56] performed on HU mice infected with *P. aeruginosa* or *K. pneumoniae*. Furthermore, the reduced B cell proliferation capacity could have serious consequences for the ability to secrete immunoglobulin.

The percentages of CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD4⁺ cells that divided after ConA stimulation were reduced in HU animals (Fig. 7B). Unfortunately, inter-individual variations, which were higher for the response to ConA, resulted in the lack of a significant difference. A close inspection of these perturbations showed that CD3⁺CD4⁺ cells divided in response to ConA (47% vs 36% for C and HU groups), even if a diminution of this cell type was observed 72 h after mitogenic stimulation (Table 3). This decrease could be because some stimulated Th cells died before the end of the experiment, as shown by our flow cytometric analyses (Fig. 5A). Decreases in the mitogenic response of T cells caused by altered gravity have been extensively documented [26,57–59]. However, it is important to note that in our study, unlike other experiments [6,28,60], cellular changes were not associated with an increase in corticosterone concentration. Our results are consistent with our previous study reporting a reduced lymphoproliferative response after LPS or ConA stimulation in the

Table 3. Variations of lymphocyte populations 72 hours after LPS stimulation.

Group	LPS Stimulation		ConA stimulation			
	Lymphocytes	CD19 ⁺	Lymphocytes	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺
C	+41.6%±3.3	+12.6%±8.1	+40.0%±2.1	+73.7%±19.3	+139.4%±22.1	-2.2%±15.7
R	+31.9%±7.0	+9.4%±2.2	+36.3%±6.4	+73.0%±11.8	+87.1%±26.2	-22.9%±8.6
HU	+16.9%*±6.2	+10.2%±4.7	+29.3%±3.5	+43.8%±12.3	+61.3% [#] ±20.7	-22.0%±14.0

C = Control, R = Restrained, HU = Hindlimb Unloaded.

* $p = 0.025$ versus C. [#] $p = 0.081$ versus C.

After 72 hours of culture, cells were incubated with fluorescent antibodies before identification by flow cytometry. Specific subpopulations of lymphocytes were determined within the lymphocyte gate. The formula [(% population stimulated - % population unstimulated)/% population unstimulated] was used to calculate the percentage of variation after stimulation with mitogens. Each group was compared to the others. $n = 5$ mice per group. Statistically significant differences were found using an ANOVA and Tukey *post-hoc* tests. After LPS stimulation, the number of total lymphocytes was increased by only 16.9% in the hindlimb unloaded (HU) group compared to 41.6% in control (C) mice, corresponding to a reduction of 60% that was significantly different ($p = 0.025$ versus C). Data are mean values ± SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0092664.t003

absence of HPA axis activation for splenocytes of mice centrifuged at 2G for 3 weeks [34]. Many authors were interested in understanding the mechanisms that could explain these changes in T cell activation under altered gravity, either associated or not associated with the stress response. Recently, Chang et al. [61] have revealed that the transcription of early genes was inhibited in human T cells activated *in vitro* during spaceflight. In particular, the transactivation of Rel/NF- κ B, CREB, and SRF gene targets were down regulated. Furthermore, Singh et al. [62] have suggested that epigenetic events could be one of the mechanisms for microgravity-induced gene expression changes and associated adverse health effects. Consequently, further research is necessary to investigate the transcription of genes in B cells, particularly those involved in Toll-like Receptor 4 signaling, which, to our knowledge, have never been studied under altered-gravity conditions.

To evaluate the consequences of B-to-T and Th-to-Tc cells shifts on the Th1/Th2 cytokine balance, a secreted cytokine bead array assay was used. No statistically significant difference could be detected in culture supernatants. Only a small increase in IL-6, GM-CSF and IFN- γ could be detected when the splenocytes of HU mice were stimulated with LPS, suggesting an increase in pro-inflammatory cytokine production that was not confirmed after ConA stimulation. These results are in agreement with Nash et al. [63], who found that the ability of mitogen-stimulated lymphocytes to secrete IL-2 and IL-1 was not affected by 7 days of antiorthostatic suspension or after spaceflight. On the other hand, some authors have suggested that the Th1/Th2 balance could be modified in astronauts [64]. However, cytokine regulation appears to be a complex process, subject to subtle physiological perturbations, involving selective alterations of specific cytokine functions [10]. Secretion of cytokines by isolated cells is not subject to the

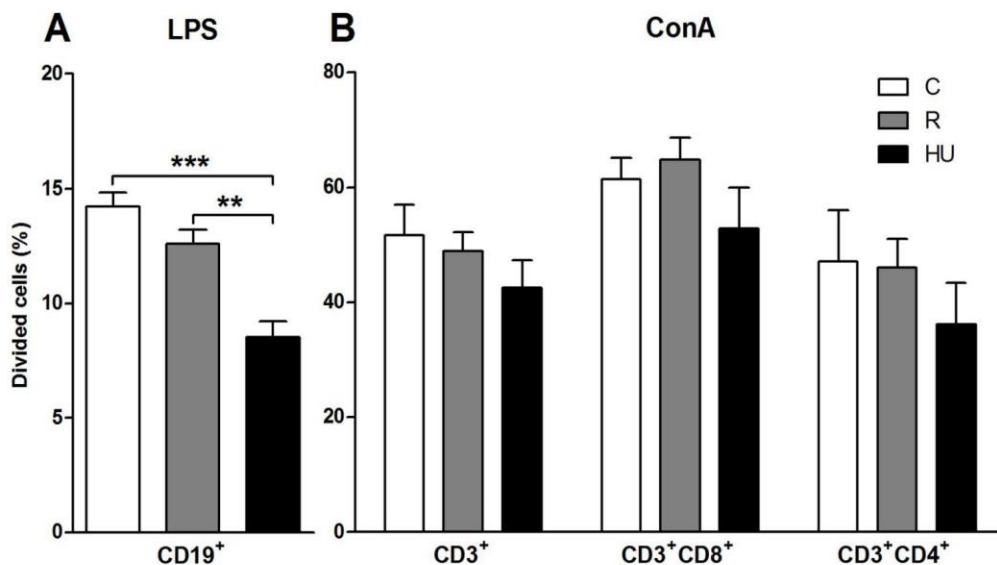


Figure 7. Percentages of dividing lymphocytes 72 hours after mitogenic stimulation. *In vitro* culture of splenocytes stained with CFSE allowed the analysis of B, Tc and Th divisions in response to a mitogenic stimulation. Subpopulations of lymphocytes were determined within the lymphocyte gate. Within each subpopulation, CFSE fluorescence was analyzed by flow cytometry. Then, the FlowJo software automatically determined generation 0 and calculated the percentage of dividing cells from the intensity of residual CFSE in cells. Each group was compared to the others. $n = 5$ mice per group. Differences were found to be statistically significant using an ANOVA and Tukey *post-hoc* test. ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$. (A) Percentages of dividing CD19⁺ B cells in response to LPS. Dividing B cells were significantly decreased in the hindlimb unloaded (HU) group compared to the restrained (R) and control (C) groups (by 33% and 40%, respectively). (B) Percentages of dividing CD3⁺ T cells, CD3⁺CD8⁺ Tc cells and CD3⁺CD4⁺ Th cells in response to ConA. No significant difference was obtained for dividing T cells despite the decreases observed for the HU group compared to C mice.

doi:10.1371/journal.pone.0092664.g007

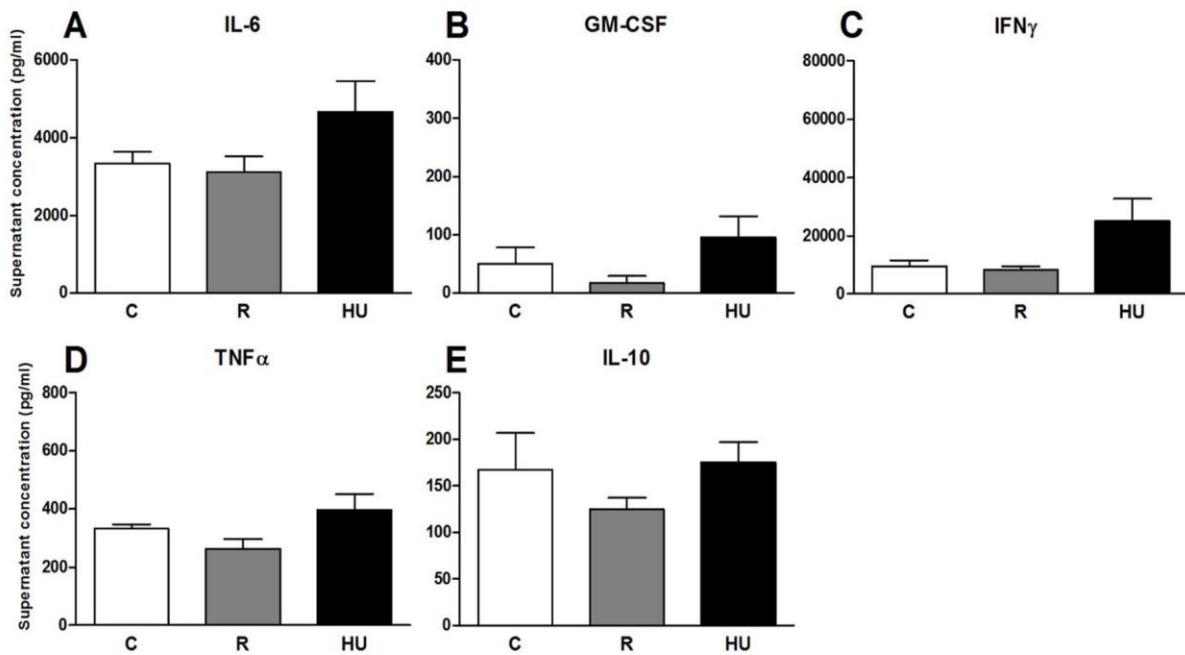


Figure 8. Cytokines secreted by splenic lymphocytes stimulated with LPS. Splenocytes were incubated with 5 μ g/ml of LPS for 72 h. Cytokine concentrations in the supernatants were determined by flow cytometry using a Flowcytomic kit. Each group, hindlimb unloaded (HU), restrained (R) and control (C), was compared to the others. $n = 5$ mice per group. No significant difference was found between the three experimental groups using ANOVA and Tukey *post-hoc* test. Cytokines whose concentrations were below the detection threshold of the kit are not indicated. doi:10.1371/journal.pone.0092664.g008

complex *in vivo* physiological environment. In addition, the 72 h incubation time needed to study cell proliferation with CFSE is most likely too long to detect cytokines that are usually secreted during the first hours following stimulation. Further experiments,

such as intracellular cytokine quantification, will be required to confirm whether the Th1/Th2 shift exists. If this is the case and the Th2 shift persists during long missions, it could represent a significant clinical risk for Th2-related autoimmune diseases,

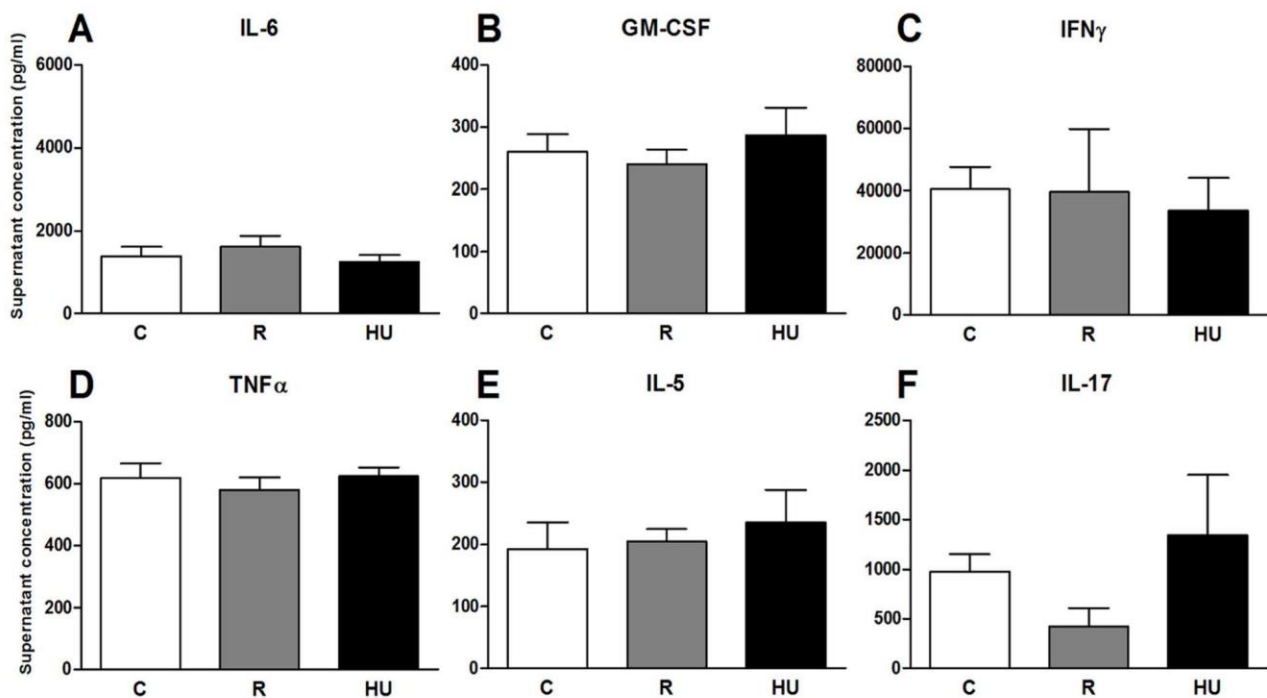


Figure 9. Cytokines secreted by splenic lymphocytes stimulated with ConA. Splenocytes were incubated with 5 μ g/ml of ConA for 72 h. Cytokine concentrations in the supernatants were determined by flow cytometry using a Flowcytomic kit. Each group, hindlimb unloaded (HU), restrained (R) and control (C), was compared to the others. $n = 5$ mice per group. No significant difference was found between the three experimental groups using ANOVA and Tukey *post-hoc* test. Cytokines whose concentrations were below the detection threshold of the kit are not indicated. doi:10.1371/journal.pone.0092664.g009

allergies, hypersensitivity and disease susceptibility related to diminished cell-mediated immunity [65].

In summary, our findings show, for the first time, that antiorthostatic suspension not only reverses the B/T ratio in the spleen but also differentially affects cell-specific mitogenic responses in the absence of increased corticosterone concentration. B cells are more vulnerable to simulated microgravity than T cells, among which Th are more sensitive than Tc. Thus, HU induces a shift in immunological homeostasis from the humoral branch toward cell-mediated mechanisms. This shift may increase the susceptibility to numerous widespread pathogens, such as Gram-negative bacteria, and compromise astronauts' defenses.

References

- Sonnenfeld G (2002) The immune system in space and microgravity. *Med Sci Sports Exerc* 34: 2021–2027.
- Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, Bueb J-L, Tschirhart E, et al. (2009) Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J Leukoc Biol* 86: 1027–1038.
- Taylor GR, Janney RP (1992) In vivo testing confirms a blunting of the human cell-mediated immune mechanism during space flight. *J Leukoc Biol* 51: 129–132.
- Taylor GR (1993) Immune changes during short-duration missions. *J Leukoc Biol* 54: 202–208.
- Durnova GN, Kaplansky AS, Portugalov VV (1976) Effect of a 22-day space flight on the lymphoid organs of rats. *Aviat Space Environ Med* 47: 588–591.
- Taylor GR, Neale LS, Dardano JR (1986) Immunological analyses of U.S. Space Shuttle crewmembers. *Aviat Space Environ Med* 57: 213–217.
- Pecaut MJ, Miller GM, Nelson GA, Gridley DS (2004) Hypergravity-induced immunomodulation in a rodent model: hematological and lymphocyte function analyses. *J Appl Physiol* 97: 29–38.
- Mandel AD, Balish E (1977) Effect of space flight on cell-mediated immunity. *Aviat Space Environ Med* 48: 1051–1057.
- Gridley DS, Slater JM, Luo-Owen X, Rizvi A, Chapes SK, et al. (2009) Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J Appl Physiol* 106: 194–202.
- Sonnenfeld G, Miller ES (1993) The role of cytokines in immune changes induced by spaceflight. *J Leukoc Biol* 54: 253–258.
- 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.
- Voss EW Jr (1984) Prolonged weightlessness and humoral immunity. *Science* 225: 214–215.
- Konstantinova IV, Rykova MP, Lesnyak AT, Antropova EA (1993) Immune changes during long-duration missions. *J Leukoc Biol* 54: 189–201.
- Rykova MP, Gertsik IG, Antropova EN, Buravkova LB (2006) [Immunoglobulin e and allergen-specific IgE antibodies in cosmonauts before and after long-duration missions on the International Space Station]. *Aviakosm Ekol Med* 40: 19–22.
- 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.
- 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.
- Huin-Schohn C, Guéguinou N, Schenten V, Bascove M, Koch GG, et al. (2013) Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB J* 27: 333–341.
- Bascove M, Frippiat J-P (2010) Molecular characterization of *Pleurodeles waltl* activation-induced cytidine deaminase. *Mol Immunol* 47: 1640–1649.
- Bascove M, Guéguinou N, Schaeferling B, Gauquelin-Koch G, Frippiat J-P (2011) Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J* 25: 2947–2955.
- Sonnenfeld G, Morey ER, Williams JA, Mandel AD (1982) Effect of a simulated weightlessness model on the production of rat interferon. *J Interferon Res* 2: 467–470.
- Felix K, Wise K, Manna S, Yamauchi K, Wilson BL, et al. (2004) Altered cytokine expression in tissues of mice subjected to simulated microgravity. *Mol Cell Biochem* 266: 79–85.
- Morey-Holton E, Globus RK, 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.
- Ilin EA, Novikov VE (1980) [Stand for modelling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats]. *Kosm Biol Aviakosm Med* 14: 79–80.
- Morey ER, Sabelman EE, Turner RT, Baylink DJ (1979) A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist* 22: S23–24.
- Wronski TJ, Morey-Holton ER (1987) Skeletal response to simulated weightlessness: a comparison of suspension techniques. *Aviat Space Environ Med* 58: 63–68.
- Cogoli A (1993) The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system. *J Leukoc Biol* 54: 259–268.
- Chapes SK, Mastro AM, Sonnenfeld G, Berry WD (1993) Antiorthostatic suspension as a model for the effects of spaceflight on the immune system. *J Leukoc Biol* 54: 227–235.
- 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.
- Morey-Holton ER, Globus RK (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92: 1367–1377.
- Nash PV, Bour BA, Mastro AM (1991) Effect of hindlimb suspension simulation of microgravity on in vitro immunological responses. *Exp Cell Res* 195: 353–360.
- Wang KX, Shi Y, Denhardt DT (2007) Osteopontin regulates hindlimb-unloading-induced lymphoid organ atrophy and weight loss by modulating corticosteroid production. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 14777–14782.
- O'Donnell PM, Orshal JM, Sen D, Sonnenfeld G, Aviles HO (2009) Effects of exposure of mice to hindlimb unloading on leukocyte subsets and sympathetic nervous system activity. *Stress* 12: 82–88.
- Choukèr A (2012) Stress Challenges and Immunity in Space - From Mechanisms to Monitoring and Preventive Strategies. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 469 p.
- Guéguinou N, Bojados M, Jamon M, Derradji H, Baatout S, et al. (2012) Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice. *Psychoneuroendocrinology* 37: 137–147.
- Wei LX, Zhou JN, Roberts AI, Shi YF (2003) Lymphocyte reduction induced by hindlimb unloading: distinct mechanisms in the spleen and thymus. *Cell Res* 13: 465–471.
- Zhang H, Hu P, Wen XL, Huang B (1999) [The effect of simulated weightlessness on the function of spleen lymphocytes and the expression of c-fos proto-oncogene in tail-suspended mice]. *Space Med Med Eng Beijing* 12: 423–425.
- 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.
- Lyons AB, Parish CR (1994) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171: 131–137.
- Pecaut MJ, Simske SJ, Flesher M (2000) Spaceflight induces changes in splenocyte subpopulations: effectiveness of ground-based models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R2072–2078.
- Chapes SK, Simske SJ, Sonnenfeld G, Miller ES, Zimmerman RJ (1999) Effects of spaceflight and PEG-IL-2 on rat physiological and immunological responses. *J Appl Physiol* 86: 2065–2076.
- Wronski TJ, Li M, Shen Y, Miller SC, Bowman BM, et al. (1998) Lack of effect of spaceflight on bone mass and bone formation in group-housed rats. *J Appl Physiol* 85: 279–285.
- Tsvirkun D, Bourreau J, Mieuset A, Garo F, Vinogradova O, et al. (2012) Contribution of social isolation, restraint, and hindlimb unloading to changes in hemodynamic parameters and motion activity in rats. *PLoS One* 7: e39923.
- Momken I, Stevens L, Bergouignan A, Desplanches D, Rudwill F, et al. (2011) Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. *FASEB J* 25: 3646–3660.
- Caren LD, Mandel AD, Nunes JA (1980) Effect of simulated weightlessness on the immune system in rats. *Aviat Space Environ Med* 51: 251–255.
- Erofeeva LM, Krasnov IB, Sapin MR (2003) Structure and function of the thymus during adaptation of rats to hypergravitation. *Bull Exp Biol Med* 135: 190–193.
- Baqai FP, Gridley DS, Slater JM, Luo-Owen X, Stodieck LS, et al. (2009) Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *J Appl Physiol* 106: 1935–1942.

Acknowledgments

We greatly thank Dr Frédéric Massin for his assistance with FACS experiments. We are grateful to Dr Nathan Guéguinou for his support during animal experiments. We sincerely thank Dr Sandra Kaminski for her help in proofreading.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JPF CLF. Performed the experiments: FG VS CLF. Analyzed the data: FG MDCB CLF. Wrote the paper: FG JPF CLF. Approved the final version of the manuscript: GPK.

47. Dracott BN, Smith CE (1979) Hydrocortisone and the antibody response in mice. I. Correlations between serum cortisol levels and cell numbers in thymus, spleen, marrow and lymph nodes. *Immunology* 38: 429–435.
48. 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.
49. Steffen JM, Musacchia XJ (1987) Disuse atrophy, plasma corticosterone, and muscle glucocorticoid receptor levels. *Aviat Space Environ Med* 58: 996–1000.
50. 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.
51. Sonnenfeld G, Mandel AD, Konstantinova IV, Berry WD, Taylor GR, et al. (1992) Spaceflight alters immune cell function and distribution. *J Appl Physiol* 73: 191S–195S.
52. Pecaunt MJ, Nelson GA, Peters LL, Kostenuik PJ, Bateman TA, et al. (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. Grigorenko DE, Sapin MR (2012) [Splenic lymphoid structures reorganization in gerbils after space flight]. *Morfologiya* 142: 67–71.
54. Grove DS, Pishak SA, Mastro AM (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.
55. Gridley DS, Nelson GA, Peters LL, Kostenuik PJ, Bateman TA, 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.
56. Belay T, Aviles H, Vance M, Fountain K, Sonnenfeld G (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.
57. Lesnyak AT, Sonnenfeld G, Rykova MP, Meshkov DO, Mastro A, et al. (1993) Immune changes in test animals during spaceflight. *J Leukoc Biol* 54: 214–226.
58. Cogoli A, Cogoli-Greuter M (1997) Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity. *Adv Space Biol Med* 6: 33–79.
59. Boonyaratanakornkit JB, Cogoli A, Li C-F, Schopper T, Pippia P, et al. (2005) Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J* 19: 2020–2022.
60. Yamauchi K, Hales NW, Robinson SM, Niehoff ML, Ramesh V, et al. (2002) Dietary nucleotides prevent decrease in cellular immunity in ground-based microgravity analog. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 93: 161–166.
61. Chang TT, Walther I, Li C-F, Boonyaratanakornkit J, Galleri G, et al. (2012) The Rel/NF- κ B pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity. *J Leukoc Biol* 92: 1133–1145.
62. Singh KP, Kumari R, Dumond JW (2010) Simulated microgravity-induced epigenetic changes in human lymphocytes. *J Cell Biochem* 111: 123–129.
63. Nash PV, Konstantinova IV, Fuchs BB, Rakhmievich AL, Lesnyak AT, et al. (1992) Effect of spaceflight on lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. *J Appl Physiol* 73: 186S–190S.
64. Crucian BE, Cabbage ML, Sams CF (2000) Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. *J Interferon Cytokine Res* 20: 547–556.
65. Frippiat J-P (2013) Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waldi* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. *Mol Immunol* 56: 434–441.

Publication n°2 : FASEB Journal, *sous presse*

Hindlimb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging

Chloé Lescale^{1,2†}, Véronique Schenten^{3†}, Dounia Djeghloul^{1,2}, Meriem Bennabi^{1,2}, Fanny Gaignier³, Katleen Vandamme⁴, Catherine Strazielle³, Isabelle Kuzniak^{1,2}, Hervé Petite⁴, Christine Dosquet^{1,2}, Jean-Pol Frippiat^{3*} and Michele Goodhardt^{1,2*}

¹ Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris 7 Denis Diderot, 75010 Paris, France.

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMRS-940, 75010 Paris, France.

³ EA7300, Stress Immunity Pathogens Laboratory, Lorraine University, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

⁴ UMR CNRS 7052, Biomécanique et Biomatériaux Ostéo-articulaires, Faculté de Médecine Lariboisière, 75010 Paris, France.

† These authors contributed equally to this study.

Short title: Decreased B lymphopoiesis upon hindlimb unloading

***Correspondence:** M. Goodhardt, UMRS1126, IUH, Hôpital Saint Louis, Paris, France. Tel: +33 1 42 49 48 89. Email: michele.goodhardt@univ-paris-diderot.fr and J.-P. Frippiat, EA7300, Stress Immunity Pathogens Laboratory, Lorraine University. Faculty of Medicine. 9 Avenue de la Forêt de Haye. F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel: ++33 3 83 68 37 23. E-mail: jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr. ***These senior authors contributed equally to this work.**

Abbreviations

HU: hindlimb unloading

Ig: immunoglobulin

HSC: hematopoietic stem cell

MPP: multipotent progenitor

LMPP: lymphoid-primed multipotent progenitor

CLP: common lymphoid progenitor

Pro-B: progenitor B cell

Pre-B: precursor B cell

BV/TV: bone volume/trabecular volume

Tb.N: trabecular number

CFU: colony-forming unit

CFU-GM: colony-forming unit-granulocyte/macrophage

Abstract

Within the bone marrow, the endosteal niche plays a crucial role in B cell differentiation. Since spaceflight is associated with osteoporosis, we investigated whether changes in bone micro-structure induced by a ground-based model of spaceflight, hindlimb unloading (HU), could affect B lymphopoiesis. To this end, we analyzed both bone parameters and the frequency of early hematopoietic precursors and cells of the B lineage after 3, 6, 13 and 21 days of HU. We found that limb disuse leads to a decrease in both bone micro-structure and the frequency of B cell progenitors in the bone marrow. While multipotent hematopoietic progenitors were not affected by HU, a decrease in B lymphopoiesis was observed as of the CLP stage with a major block at the pro-B to pre-B cell transition (5-10 fold decrease). The modifications in B lymphopoiesis were similar to those observed in aged mice and, as with aging, decreased B cell generation in HU mice was associated with reduced expression of B cell transcription factors, EBF and Pax5, and an alteration in STAT5-mediated IL-7 signaling. These findings demonstrate that mechanical unloading of hind limbs results in a decrease in early B cell differentiation resembling age-related modifications in B lymphopoiesis.

Key words: Bone remodeling, B cell differentiation, Gravity, Space conditions, Immunosenescence

Introduction

Human bioastronautic programs have grown during the last 50 years. Medical and physiological findings from these missions have demonstrated that spaceflight impacts almost all physiological systems including muscle atrophy, bone demineralization, cardiovascular and metabolic dysfunctions, impaired cognitive processes and reduced immunological competence. These adaptive responses can affect crew health and performance both in space and upon return to Earth. Indeed, fifteen of the 29 Apollo astronauts contracted bacterial or viral infections either during the mission or within a week of returning (1-3). Prolonged exposure to microgravity induces osteopenia, with decreased bone formation and mineralization and increased bone resorption (4, 5), and there are presently no effective countermeasures to mitigate these problems. Consequently, expanding our knowledge on the effects of long-duration spaceflight on crew health and performance is clearly a pre-requisite for long-term spaceflight.

Immune-competent B and T lymphocytes are derived from hematopoietic stem cells (HSC) that reside in the bone marrow in specialized niches made up of bone and vascular structures, including bone forming osteoblasts and bone resorbing osteoclasts (6). Interactions between HSC and bone marrow niches control the balance between quiescence, self-renewal and differentiation of HSC (7-9). Given the essential role of HSC-niche interactions in hematopoietic regulation, it is likely that changes in bone micro-structure during spaceflights may also lead to changes in the function and composition of mature blood cells.

Due to limitations both in the availability and the experimental protocols that can be carried out with samples from astronauts following space missions, hindlimb unloading (HU) in rodents has been developed as a ground-based model to study the effects of spaceflight. This model includes situational and confinement stress, cephalic fluid shifts and non-load bearing status of the hind limbs (10). Notably, HU induces a reduction in bone mass, associated with increased generation of adipocytes and decreased osteoblast differentiation, and mimics spaceflight-induced immunological changes (11-14). Thus, exposure to HU induces profound alterations in skeletal metabolism that could in turn affect hematopoiesis.

A number of previous observations support this hypothesis. Indeed, a decrease in the number of bone marrow myeloid progenitors, as measured by colony-forming assays, was observed both in spaceflight and following HU (15-19). *In vitro* culture of human CD34⁺ bone marrow progenitors during spaceflight confirmed the inhibitory effect of microgravity on erythropoiesis and myelopoiesis (20), while more recently Ortega et al. reported changes in the

maturation/activation of granulocytic cells in the bone marrow of C57BL/6 mice after a 13-day spaceflight (21). Despite well-documented spaceflight-induced immune dysfunction, relatively few studies have investigated the effect of microgravity on humoral responses and B cell differentiation. We have recently shown that the expression of immunoglobulin (Ig) heavy chain and of the lymphoid-determining transcription factor Ikaros are modified when embryos of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* are subjected to gravity changes, suggesting a modification in B lymphopoiesis (22). Spaceflight conditions further affect antibody production in response to antigenic stimulation in adult amphibians. Indeed, the expression of IgY (the counterpart of mammalian IgA) was increased in flown *P. waltl* (23) as previously observed in cosmonauts (24). Furthermore, the utilization of VH gene subgroups, the expression of individual VH genes and the frequency of Ig somatic hypermutation were found to be modified under spaceflight conditions (23, 25, 26).

Given the scarcity of data regarding the impact of spaceflight on B cell development, we investigated the effects of HU on B cell differentiation. The results of this study reveal that HU leads to a decrease in B lymphopoiesis starting at the stage of early lymphoid-committed progenitors. Interestingly, HU-induced modifications present many similarities with the changes observed in aging mice both with regard to trabecular bone micro-architecture and to the cellular and molecular changes accompanying reduced B cell differentiation.

Materials and Methods

Animals

Experiments were conducted using young (3 months) or old (18-22 months) C57BL/6J male mice purchased from Janvier Laboratories (France). Animals were housed in vented animal cabinets (Noroit, Bouaye, France) under controlled temperature (22°C) and 12 h: 12 h dark light. Prior to the start of the experiments, mice were allowed to rest for one week following shipment by groups of four mice in standard cages. Animals were treated in accordance with the National Legislation and experimental protocols were approved by the local ethics committee: (Comité d'éthique en expérimentation animale Paris Lariboisière-Villemin (Permit Number : CEEALV/2010-03-06) , Comité d'Ethique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale (Permit Number: CELMEA-2012-0008)).

Hindlimb unloading

Three-month-old mice were isolated five days before the beginning of the experiments in standard or hindlimb unloading (HU) cages (312 mm in length, 197 mm in width and 260 mm in height). Mice were suspended by using a dressing retention sheet wrapped around the tail and a wire hooked on a swivel pulley system as described (10, 12). The swivel pulley glides along two stainless steel rods that run the length of the cage providing the mouse with a full 360° range of movement. The angle of suspension for HU mice was adjusted to 25-30° such that only the forelimbs touch the grid at the bottom of the cage. Throughout the suspension period, mice were provided with food and water *ad libitum* and weighed daily. Unsuspended control mice were housed individually in cages of the same size. Groups of three mice (HU and controls) were sacrificed after 3, 6, 13 and 21 days of suspension. Experiments were repeated two to five times for each time point.

Immunoglobulin, corticosterone and cytokine quantifications

Serum immunoglobulin (IgA, IgG and IgM) and corticosterone concentrations were determined using commercial ELISA kits (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA for Ig and Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA for corticosterone) according to manufacturer's instructions. In each case, concentrations were calculated using a 4-parameter curve. Cytokines (GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 and TNF- α) were quantified using

the Mouse Th1/Th2 10 plex Flowcytomix Kit (eBioscience, Montrouge, France) and a two-laser FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Marseille, France).

Flow cytometry and cell sorting

Cell populations from the femur or the tibia were identified based on the expression of the following markers: HSC ($\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{Sca-1}^{\text{hi}} \text{Flt3}^-$), MPP ($\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{Sca-1}^{\text{hi}} \text{Flt3}^{\text{lo}}$), LMPP ($\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{Sca-1}^{\text{hi}} \text{Flt3}^{\text{hi}}$), CLP ($\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^+ \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{Sca-1}^{\text{lo}} \text{Flt3}^+$), Pro-B ($\text{B220}^{\text{lo}} \text{CD43}^+ \text{CD19}^+ \text{IgM}^-$), Pre-B ($\text{B220}^{\text{lo}} \text{CD43}^- \text{CD19}^+ \text{IgM}^-$), immature B cells ($\text{B220}^{\text{lo}} \text{CD43}^- \text{CD19}^+ \text{IgM}^+$), matures B cells ($\text{B220}^{\text{hi}} \text{CD43}^- \text{CD19}^+ \text{IgM}^+$). Freshly isolated bone marrow cells were treated with Fc-block (CD16/CD32). For the analysis of HSC, MPP, LMPP and CLP, cells were first stained with biotin-conjugated lineages antibodies (B220 (RA3-6B2), CD19 (1D3 or 6D5), NK1.1 (PK136), CD11b (M1 / 70), Gr-1 (RB6-8C5), TER-119 (TER-119)), and then stained with anti-Sca-1-FITC (E13-161.7), anti-c-Kit-APC (2B8), anti-IL-7R-PECy7 (A7R34) and anti-Flt3-PE (A2F10). Labeling with biotin-conjugated antibodies was revealed using streptavidin-eFluor450. For the analysis of pro-B, pre-B, immature and mature B cells, bone marrow cells were stained with anti-B220-A488 (RA3-6B2), anti-CD43-PE (S7), anti-CD19-APC (1D3), anti-IgM-Biotin (R6-60.2) and anti-IL-7R-PECy7 (A7R34). Labeling with biotin anti-IgM was revealed using streptavidin-PerCPCy5.5. Cell populations from the thymus were identified based on the expression of the following markers: total T cells (CD3^+), helper T cells ($\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$) and cytotoxic T cells ($\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$). Thymocytes were stained with anti-CD3 ϵ -APC (17A2), anti-CD4-PE (RM4-5) and anti-CD8 α -PE-Cy7 (53–6.7). Cells were analyzed using a FACS Canto II (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) or a FC500 (Beckman Coulter, Marseille, France) flow cytometer and sorted with a MoFlo cell sorter (DAKO Cytomation) or a FACSAria cell sorter (BD Biosciences). For cell sorting, 4 mice were pooled in each experiment and lineage-positive (Lin^+) cells were first depleted by magnetic-activated cell separation using streptavidin microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France) according to the manufacturer's instructions. All antibodies were purchased from BD Biosciences except anti-IL-7R-PECy7 (A7R34), anti-CD3 ϵ -APC (17A2), anti-CD4-PE (RM4-5) and anti-CD8 α -PE-Cy7 (53–6.7) that were from eBiosciences (Montrouge, France) and anti-CD19 (6D5) that was from Beckman Coulter (Marseille, France).

Colony forming unit assay

Blood was collected by a ventricular puncture prior to euthanasia. Red blood cells were lysed with a solution of ammonium chloride (Stem Cell Technologies, Grenoble, France). Then, cells were washed in IMDM medium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) containing 2% FCS. 2×10^5 cells were seeded in 1 mL of methylcellulose-based medium containing recombinant cytokines (SCF, IL-3, IL-6 and Epo- GF M3434, Stem Cell Technologies). Each sample was analyzed in duplicate. The total number of colonies was determined after 12 days of culture at 37°C.

Intracellular staining of phospho-STAT5

Freshly isolated bone marrow cells from the femur or tibia of control and HU mice were depleted of IgM⁺ cells by magnetic separation using biotin conjugated IgM antibody (R6-60.2) and streptavidin microbeads. IgM⁻ cells were then incubated with CD19 microbeads and enriched for CD19⁺ cells (> 90% CD19⁺IgM⁻ cells after purification). Cells were starved in Opti-MEM with 0.1% serum for 1 h at 37°C and then stimulated with 100 ng/mL of mouse recombinant IL-7 (R&D Systems Europe, Lille, France) for 15 min at 37°C. Immediately after stimulation, cells were fixed in BD Phosflow Lyse/Fix Buffer for 10 min at 37°C. Then, cells were washed and resuspended in BD Phosflow Perm III Buffer for 30 min at 4°C. After washing, cells were treated with Fc-block (CD16/CD32) and stained simultaneously with antibodies for phospho-STAT5 (47) and cell surface markers B220 (RA3-6B2) and CD43 (S7). Purified CD19⁺IgM⁻ cells were gated on B220^{lo}CD43⁺ population and the percentage of phospho-STAT5⁺ cells was determined. All antibodies were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France).

Quantitative RT-PCR

RNA was extracted from sorted cells using the RNeasy Micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed using SuperScript III (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and random hexamers. Quantitative RT-PCRs were performed using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France): *Hprt1*: Mm00-446968_m1, *Ebfl1*: Mm00395519_m1, *Pax5* (custom assay): Forward primer: AGCCATGGTTGTGTCAGCAA, Reverse primer: CCCGGCTTGATGCTTCCT, FAMTM dye-labeled TaqMan[®] MGB probe: TCATAATACCTGCCAAGAATT, *Gata3*: Mm00484683_m1, *Sfpil* (PU.1): Mm00488142_m1, *Il-7ra*: Mm00434295_m1, *Tcf3* (E2A): Mm01175588_m1, *Hprt1*: Mm00446968_m1, *ActB*: Mm01205647_g1. The cycling protocol was: 2 min at 50°C, 10 min

at 95°C and then 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Detection was performed using the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Each qRT-PCR was performed in triplicate and the relative expression of each transcript was calculated with ABI Prism 7000 Sequence Detection System software and normalized to the amounts of Hprt1 and ActB mRNAs.

Micro-X-ray computed tomography (μ -CT)

Tibias were fixed in 4% paraformaldehyde and preserved in 70% ethanol until analysis. To evaluate bone architecture, proximal parts of the tibiae of control, HU and aged mice were subjected to a Skyscan 1172 desk-top MicroCT (Skyscan, Aartselaar, Belgium). The Skyscan 1172 machine is equipped with an 80 kV X ray source with a camera pixel size of 9 μ m. μ CT images were made within the midsagittal planes in the metaphyseal region of the bones. During the scan, tibias were immobilized in a customized polystyrene holder. Scans resulted in reconstructed 3-D data sets with a pixel size of 6.71 μ m (power setting at 60 kV - 100 μ A). Data were subsequently quantified using the CTAn automated image analysis system (Skyscan). The growth plate was used as reference to determine the trabecular volume of interest (VOI) in the axial direction. The region of interest was set with its closest edge at 500 μ m distally from the growth plate and over a length of 1500 μ m (= 223 slices). The distance of 500 μ m was chosen such that no primary spongiosa was included in trabecular VOI. For each transverse slice, VOI was established manually in an area of trabecular bone as large as possible. The registered gray-value images were segmented using a Gaussian filter into binary images, using a low-pass filter to remove noise and a fixed threshold (23.6 % of maximal gray-scale value) to extract the mineralized bone phase. Bone volume fraction (BV/TV) and trabecular number (Tb.N) were calculated 3-D as measures of trabecular bone mass and distribution.

Statistical analysis

Two groups' comparisons were performed using the Student's *t*-test when normality and homogeneity of variances were ascertained. When this was not the case, two groups' comparisons were performed using the Mann-Whitney test. *p*-values < 0.05 indicate significant difference.

Results

Kinetics of bone micro-architectural alterations and evaluation of stress during hindlimb unloading

As previously reported, mechanical unloading led to substantial changes in tibia bone mass and micro-architecture (Figure 1A). A significant decrease in trabecular bone volume (BV/TV) and the number of trabeculae (Tb.N) was observed as of day 6 and bone morphometric parameters were progressively reduced up to day 21 of HU (Figure 1A). We also studied the evolution of body weight during the experimental period. As noted by others (12, 27, 28), HU mice lost approximately 10% body weight in the first two days and their weight remained below that of controls during the 21 days of HU (Figure 1B). To determine whether in our hands HU induces a stress response, we quantified corticosterone, the major stress hormone in rodents, as well as cytokines regulating immune responses in the serum of HU mice. Our results show that serum corticosterone concentrations were constant throughout the 21 days of suspension and close to levels observed in unstressed mice (50 ng/mL) (Figure 1C). Furthermore, cytokine concentrations measured at days 3, 6, 13 and 21 remained below detection level in both HU and control mice (data not shown). These data, together with behavior examination (C. Strazielle, unpublished observations), indicate that mice adapted to HU in less than 3 days.

Increased egress of hematopoietic stem/progenitor cells following hindlimb unloading

HSC and early progenitors interact with specialized niche cells located close to the bone endosteum. Given that bone parameters are strongly affected by HU, we considered the possibility that these changes may modify interactions between hematopoietic progenitors and endosteal stromal cells leading to enhanced egress of hematopoietic cells out of the bone marrow. To investigate the effect of mechanical unloading on HSC mobilization, we compared the level of circulating hematopoietic stem and progenitor cells in peripheral blood of control and HU mice by colony-forming assays (CFU). As shown in Figure 2A, there was a significant increase in the number of CFU-GM in the peripheral blood of mice subjected to HU. These results indicate that HU leads to increased release of hematopoietic progenitors to the circulation, suggesting that interactions with the endosteal niche may be impaired.

Hindlimb unloading leads to decreased B lymphopoiesis

To investigate whether HU-associated alterations in trabecular bone micro-architecture are associated with changes in hematopoiesis and B cell generation, we first quantified the frequency of early hematopoietic progenitors and B-lineage committed cells in the bone marrow of HU and control mice by flow cytometry. During B cell differentiation, HSC give rise to multipotent progenitors (MPP), then to lymphoid-primed (LMPP) and common lymphoid progenitors (CLP) that in turn can give rise to B committed pro-B and pre-B cell precursors and finally to immature and mature B cells (29-31). There was no change in the frequency of multipotent HSC, MPP and LMPP in the bone marrow following HU (Figure 2B). However, we found a significant decrease in the frequency of early lymphoid (CLP) and B-committed progenitors as of day 3 of HU and levels of these cells remained low throughout the 21 days of mechanical unloading (Figure 2B). CLP and pro-B cells were decreased approximately 2-fold in the bone marrow of HU mice, while the largest decrease was observed within the pre-B cell compartment, which was reduced 5-10 fold (Figure 2B). Newly formed B220^{lo} IgM⁺ B cells and mature B220^{hi} IgM⁺ cells were also significantly decreased following HU, although to a lesser extent than pre-B cells, probably due to homeostatic compensatory mechanisms. No change in serum Ig was observed during the 21-day period of HU investigated (Figure 3). Taken together, these data indicate that HU leads to impaired bone marrow B lymphopoiesis.

HU-induced decreased B lymphopoiesis is associated with reduced *Ebfl* and *Pax5* expression and altered IL-7 signaling

Lineage commitment and subsequent differentiation of hematopoietic progenitors is controlled by a network of transcription factors (32). PU.1 is a regulator of early hematopoietic progenitor lymphoid/myeloid lineage choice, while the lymphoid transcription factors E2A, EBF and PAX5 are essential for B-lineage specification and commitment and GATA3 is required for T cell commitment and differentiation. To investigate the molecular mechanisms underlying the decline in B lymphopoiesis observed following mechanical unloading, we first compared the expression of these transcription factors in CLP isolated from control and 6-days-HU mice. We found a two- to three-fold decrease in the level of *Ebfl* and *Pax5* transcripts in CLP of HU mice, while expression of the other transcription factors were not affected (Figure 4A). These results show that the reduction in B cell generation observed in HU mice is associated with a decrease in the expression of two key B lineage transcription factors, EBF and PAX5.

Since IL-7 plays a critical role in murine B cell differentiation (33), we next investigated the impact of HU on the phosphorylation of STAT5, which is the essential mediator of IL-7 signaling during early B cell development. Cell surface expression of IL-7 receptor α -chain (IL-7R α) was similar in pro-B cells isolated from control and HU mice (Figure 4B). In contrast, we observed a decrease in the phosphorylation of STAT5 following IL-7 stimulation in pro-B cells of HU mice (Figure 4 C and D). Taken together, these results show that decreased B lymphopoiesis following mechanical unloading is associated with both impaired STAT5-mediated IL-7 signaling and reduced expression of B cell specifying and commitment factors.

Comparison of HU and aged mice

Spaceflight has been proposed to be associated with a process of accelerated aging (34). We therefore compared B lymphopoiesis and bone parameters in HU and aged mice. Our analysis of hematopoietic progenitors showed that the well-documented increase in HSC with age was not reproduced following HU (Figure 5A). However, we observed a strikingly similar profile of B-lineage cells in the bone marrow of HU and aged mice (Figure 5 B). As previously reported (35, 36), there is a decrease in B cell differentiation as of the CLP cell stage and a more pronounced reduction at the pre-B cell transition in old mice (> 18 months of age) like in mice subjected to HU. Notably, in both HU and aging mice the decrease in B lymphopoiesis is associated with decreased expression of EBF and Pax5 in CLP as well as impaired IL7-mediated STAT-5 phosphorylation in B cell progenitors (Figure 4 and ref 35). We also compared the effects of age and mechanical unloading on trabecular bone architecture using micro-CT analysis. Our results revealed a substantial decrease both in the trabecular bone volume (BV/TV) and in the number of trabeculae (Tb.N) of old mice (> 18 months of age) that was very similar to that observed after 21 days of HU. However, trabeculae of old mice were thicker and more dispersed than in HU mice (Figure 5C and D). These results indicate that HU-induced changes in trabecular bone micro-architecture are similar but less pronounced than those occurring with age and are associated with a comparable impairment in B lymphopoiesis.

Discussion

In this study, we show that mechanical unloading causes both bone remodeling and a concomitant decrease in the generation of B lymphocytes in the bone marrow. Decreased B lymphopoiesis was observed rapidly after HU and B cell progenitor populations remained low during the 21 days of unloading. In contrast, no change was observed in hematopoietic stem cell or multipotent hematopoietic progenitor populations.

The differentiation of B cells from HSC is dependent on interactions with bone marrow stromal cells and is regulated by IL7-signaling and by the coordinated action of a network of transcription factors. We found that the decrease in B lymphopoiesis following HU was associated with reduced expression of EBF and PAX5 in early lymphoid progenitors (CLP) and impaired STAT5-mediated IL-7 signaling in B cell precursors of HU mice. The transcription factors EBF and PAX5 are key regulators of B cell differentiation (32). EBF plays a crucial role in B-lineage specification and, together with PAX5, in subsequent commitment and differentiation steps (37-41), while IL7-receptor signaling and activation of STAT5 have been shown to promote the survival of pro-B cells and facilitate pre-B cell expansion (42). Reduced IL7-signaling and expression of EBF and PAX5 following mechanical unloading may therefore underlie the decrease in early B cell progenitors and impaired pro-B to pre-B cell differentiation observed in the bone marrow of these mice. Unlike B-lineage transcription factors, we did not observe a decrease in the expression of GATA3, a T-specific factor, in CLP from HU mice suggesting that T cell potential may not be decreased in bone marrow lymphoid progenitors. In line with this, we found that T cell subsets are unchanged in the thymus of HU mice (data not shown) thereby supporting our previous findings suggesting that T lymphopoiesis may be less sensitive to changes in gravity (22).

The bone marrow microenvironment regulates HSC proliferation and differentiation via signals from specialized stromal cells (43). We found that hindlimb unloading leads to a decrease in the number of CLP and B-committed progenitors, but no change in the HSC compartment was observed. This is interesting in the light of recent studies showing that HSC and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches (44). Notably, early B cell progenitors interact with and depend on osteoblast progenitors and CXCL12-expressing reticular cells situated at the endosteal surface, whereas HSC are in large part dependent on a perivascular niche composed of endothelial cells and mesenchymal cell progenitors. Mechanical unloading leads to a dysbalance between bone formation and resorption with a net

loss of bone mass. Given the compartmentalization of bone marrow niches, it is therefore possible that HU-induced bone remodeling preferentially targets osteolineage cells at endosteal niches and hence has a greater effect on B committed progenitors than HSC and multipotent progenitors. As B cell progenitors rely on distinct bone marrow niches at different stages of their differentiation (45, 46), it would be interesting to investigate which stromal cell populations are affected by HU.

Dynamic regulation of bone remodeling, hematopoietic cells and their evolving niches via neurotransmitter signaling are part of the host defense and repair mechanisms. Sympathetic signals from the nervous system activated by stress conditions affect both bone turnover and HSC migration and development (47). Indeed, chronic corticosterone exposure leads to a decrease in multipotent hematopoietic stem/progenitors and B-lineage cells as well as bone marrow stromal progenitor cell numbers (48, 49). Serum corticosterone concentrations were analysed from day 3 and throughout the suspension period and no change was observed in HU mice in this study. Our data therefore indicate that mice adapted rapidly to HU and while we cannot rule out that there was a transient increase in corticosterone in the first two days of HU, this is unlikely to explain the persistent decrease in B cell progenitors. Indeed, unlike the detrimental effects of chronic stress, short-term acute stressors appear to rather increase immunity (50). As observed in other studies, HU mice had a lower body mass as compared to controls (12, 27, 28). Energy intake and expenditure, despite the provision of food in sufficient amounts, is a likely explanation to this observation. Indeed, astronauts are burning more calories than they are consuming, resulting in a negative energy balance (51). Similarly, it was shown that energy expenditure is significantly increased in HU rats and mice (52, 53).

Several immunological changes observed in astronauts resemble those occurring with age, including a decrease in T cell and antibody responses, decreased cytotoxic cell functions and impaired monocyte/macrophage phagocytosis and oxidative burst (2, 3, 54, 55). As with increasing age, spaceflight is also associated with osteoporosis and reduction in muscle mass. In this study, we show that hindlimb unloading leads to a decrease in the generation of bone marrow B cell progenitors that is remarkably similar to that observed with age. Like in old mice, decreased B lymphopoiesis induced by mechanical unloading is observed as of the CLP stage and there is a major block at the pro-B to pre-B cell transition (56). Furthermore, we found that this decrease was associated with intrinsic changes in EBF and PAX5 expression and IL-7 signaling in bone marrow progenitors of HU mice, as previously reported in aged mice (35). These findings suggest that similar mechanisms may underlie impaired B cell differentiation occurring with age and following mechanical unloading. As well as cell intrinsic factors, recent

evidences suggest that changes in bone marrow niches and their interaction with hematopoietic progenitors may also contribute to impaired hematopoiesis with age (57-59). We observed major changes in trabecular bone micro-architecture in tibiae of old mice that were similar, but more pronounced, than those of mice subjected to 21 days of mechanical unloading. This suggests that adaptation of the musculoskeletal system to reduced loading may be a major aspect of aging like spaceflight.

In conclusion, this study shows that hindlimb unloading induces changes in B lymphopoiesis over a few days similar to those observed with age and should therefore be an interesting model to improve our understanding of the relationship between bone remodeling and B lymphopoiesis, both in the context of spaceflight and normal aging. In the future, it would be interesting to determine whether unloading-induced decrease in B lymphopoiesis is reversible, as has been suggested for the bone micro-architecture (60), hence leading to possible countermeasures to improve immune responses following spaceflight in astronauts or in elderly and bed-ridden populations.

Acknowledgments

We thank Dr. L. Vico and Dr. M.-H. Lafage-Proust, Saint-Etienne France, for advice concerning the hindlimb unloading protocol and for providing hindlimb unloading cages. The authors also wish to thank the X-rays platform IMOSAR. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Fondation pour la Recherche Médicale, the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES), the Agence Nationale de la Recherche (ANR NT09-632666), the Université and the Région de Lorraine. V.S. was supported by a CNES post-doctoral fellowship, F.G. by a CNES and Région Lorraine doctoral fellowship and K.V. by a FWO-Vlaanderen (Fund for scientific research-Flanders, Belgium) post-doctoral fellowship.

Figure legends

Figure 1. Kinetics of bone parameters, body weight and serum corticosterone levels during hindlimb unloading (HU). **(A)** Evolution of trabecular bone volume (BV/TV) and trabecular number (Tb.N) in the tibia of mice subjected to 3 (n = 6), 6 (n = 12), 13 (n = 10) or 21 days (n = 6) of HU. Values are expressed as percent difference relative to controls. Stars indicate statistically significant differences compared to controls after statistical treatment as described in the materials and methods section. **(B)** Evolution of mice body weight during HU. Day zero corresponds to the beginning of HU. Values represent means \pm SEM with n = 24 from D0 to D3, n = 18 from D4 to D6, n = 12 from D7 to D13 and n = 6 from D14 to D21. Stars indicate statistically significant differences between control and HU mice at each time point. CTL, controls. **(C)** Serum corticosterone concentration after 3, 6, 13 and 21 days of HU. The corticosterone kinetic was repeated twice with n = 3 for each time point. Histograms represent mean \pm SEM. No statistically significant difference was observed at any time point. CTL, controls.

Figure 2. Changes in B lymphopoiesis following hindlimb unloading (HU). **(A)** Mobilization of hematopoietic progenitors after 21 days of HU. Results are expressed as the total number of CFU obtained after 12 days of culture of peripheral blood mononuclear cells of control (CTL) or HU mice. **(B)** Frequencies of hematopoietic progenitors and cells of the B lineage in the femurs of controls (●) and mice suspended for 3 (n = 6), 6 (n = 6), 13 (n = 5) or 21 (n = 11) days (○). Stars indicate statistically significant differences between control and HU mice. HSC, hematopoietic stem cells; MPP, multipotent progenitors; LMPP, lymphoid-primed progenitors; CLP, common lymphoid progenitors.

Figure 3. Serum immunoglobulin concentrations after 3, 6, 13 or 21 days of HU. n = 6 at each time point for control and HU mice. Histograms represent mean \pm SEM. HU mice were compared to controls at each time point. No statistically significant difference was observed at any time point.

Figure 4. Changes in transcription factor expression and IL-7 signaling in HU and aged mice. **(A)** Expression of lymphoid transcripts in CLP purified from the bone marrow of mice subjected to 6 days of HU, corresponding young controls and aged mice (> 18 months). mRNAs

levels were determined by qRT-PCR and normalized with respect to *Hprt1*. Results are expressed relative to CLP of young controls (set to 1). Four mice per group were pooled for each experiment and two independent experiments were performed in triplicate. **(B)** Expression of IL-7R α on pro-B cells of control (solid line) or 6-day-HU (dashed line) mice. **(C)** Phosphorylation of STAT5 in response to IL-7 in pro-B cells of control (solid line) or 6-day-HU (dashed line) mice. **(D)** Percentage of STAT5-P positive pro-B cells after stimulation with IL-7 in control (black circle), 6-day-HU (open circle) and aged (open triangle) mice. Each point corresponds to one mouse. Horizontal lines represent the median. * $p < 0.05$.

Figure 5. Comparison of hematopoietic progenitors and bone parameters in HU and aged mice. **(A)** Frequencies of early hematopoietic progenitors in the femurs of controls ($n = 10$), 21-day-HU ($n = 11$) and aged ($n = 7$) mice. **(B)** Frequencies of B lineage cells in the femurs of controls ($n = 13$), 21-day-HU ($n = 11$) and aged ($n = 5$) mice. (A, B) Results are expressed as a percentage of mononuclear cells. Statistically significant differences * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **(C)** Bone parameters as assessed by micro-tomography in the tibia of 21-day-HU ($n = 10$) and 19-month-old ($n = 8$) mice. Asteriks indicate statistically significant differences compared to 3-month-old controls ($n = 10$), * $p < 0,05$. **(D)** Segmented cross-sectional images of the proximal tibia (top) and 3D reconstruction of metaphyseal trabecular bone separated from the cortex (bottom) for control, 21-day-HU and old mice.

References

1. Kimzey, S. L., Johnson, P. C., Ritzman, S. E., and Mengel, C. E. (1976) Hematology and immunology studies: the second manned Skylab mission. *Aviat Space Environ Med* **47**, 383-390
2. Gueguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J. L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C., and Fripiat, 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
3. Fripiat, J. P. (2013) Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. *Mol Immunol* **56**, 434-441
4. Sievanen, H. (2010) Immobilization and bone structure in humans. *Arch Biochem Biophys* **503**, 146-152
5. Saxena, R., Pan, G., Dohm, E. D., and McDonald, J. M. (2011) Modeled microgravity and hindlimb unloading sensitize osteoclast precursors to RANKL-mediated osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab* **29**, 111-122
6. Mercier, F. E., Ragu, C., and Scadden, D. T. (2012) The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol* **12**, 49-60
7. Wang, L. D., and Wagers, A. J. (2011) Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 643-655
8. Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M., and Scadden, D. T. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846
9. Xie, Y., Yin, T., Wiegraebe, W., He, X. C., Miller, D., Stark, D., Perko, K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J. C., Park, J., Haug, J. S., Wunderlich, J. P., Li, H., Zhang, S., Johnson, T., Feldman, R. A., and Li, L. (2009) Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* **457**, 97-101
10. Morey-Holton, E., Globus, R. K., Kaplansky, A., and 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
11. Ahdjoudj, S., Lasmoles, F., Holy, X., Zerath, E., and Marie, P. J. (2002) Transforming growth factor beta2 inhibits adipocyte differentiation induced by skeletal unloading in rat bone marrow stroma. *J Bone Miner Res* **17**, 668-677
12. Amblard, D., Lafage-Proust, M. H., Laib, A., Thomas, T., Ruegsegger, P., Alexandre, C., and Vico, L. (2003) Tail suspension induces bone loss in skeletally mature mice in the C57BL/6J strain but not in the C3H/HeJ strain. *J Bone Miner Res* **18**, 561-569
13. Sonnenfeld, G. (2003) Animal models for the study of the effects of spaceflight on the immune system. *Adv Space Res* **32**, 1473-1476
14. Sonnenfeld, G. (2005) Use of animal models for space flight physiology studies, with special focus on the immune system. *Gravit Space Biol Bull* **18**, 31-35
15. 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
16. Sonnenfeld, G., Mandel, A. D., Konstantinova, I. V., Berry, W. D., Taylor, G. R., Lesnyak, A. T., Fuchs, B. B., and Rakhmievich, A. L. (1992) Spaceflight alters immune cell function and distribution. *J Appl Physiol (1985)* **73**, 191S-195S
17. Armstrong, J. W., Kirby-Dobbels, K., and Chapes, S. K. (1995) The effects of rM-CSF and rIL-6 therapy on immunosuppressed antiorthostatically suspended mice. *J Appl Physiol (1985)* **78**, 968-975

18. Dunn, C. D., Johnson, P. C., Lange, R. D., Perez, L., and Nessel, R. (1985) Regulation of hematopoiesis in rats exposed to antiorthostatic, hypokinetic/hypodynamia: I. Model description. *Aviat Space Environ Med* **56**, 419-426
19. Vacek, A., Michurina, T. V., Serova, L. V., Rotkowska, D., and Bartonickova, A. (1991) Decrease in the number of progenitors of erythrocytes (BFUe, CFUe), granulocytes and macrophages (GM-CFC) in bone marrow of rats after a 14-day flight onboard the Cosmos-2044 Biosatellite. *Folia Biol (Praha)* **37**, 35-41
20. 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
21. 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 (1985)* **106**, 548-555
22. Huin-Schohn, C., Gueguinou, N., Schenten, V., Bascove, M., Gauquelin-Koch, G., Baatout, S., Tschirhart, E., and Frippiat, J. P. (2013) Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *Faseb J* **27**, 333-341
23. 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 (1985)* **98**, 905-910
24. 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
25. Bascove, M., Huin-Schohn, C., Gueguinou, 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
26. Bascove, M., Gueguinou, 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
27. Wang, K. X., Shi, Y., and Denhardt, D. T. (2007) Osteopontin regulates hindlimb-unloading-induced lymphoid organ atrophy and weight loss by modulating corticosteroid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14777-14782
28. Gaignier, F., Schenten, V., De Carvalho Bittencourt, M., Gauquelin-Koch, G., Frippiat, J. P., and Legrand-Frossi, C. (2014) Three weeks of murine hindlimb unloading induces shifts from B to T and from th to tc splenic lymphocytes in absence of stress and differentially reduces cell-specific mitogenic responses. *PLoS One* **9**, e92664
29. Adolfsson, J., Borge, O. J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S. E. (2001) Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* **15**, 659-669
30. Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O. J., Thoren, L. A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S. E. (2005) Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306
31. Lai, A. Y., Lin, S. M., and Kondo, M. (2005) Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J Immunol* **175**, 5016-5023
32. Rothenberg, E. V. (2014) Transcriptional control of early T and B cell developmental choices. *Annu Rev Immunol* **32**, 283-321

33. Clark, M. R., Mandal, M., Ochiai, K., and Singh, H. (2014) Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **14**, 69-80
34. Vernikos, J., and Schneider, V. S. (2010) Space, gravity and the physiology of aging: parallel or convergent disciplines? A mini-review. *Gerontology* **56**, 157-166
35. Lescale, C., Dias, S., Maes, J., Cumano, A., Szabo, P., Charron, D., Weksler, M. E., Dosquet, C., Vieira, P., and Goodhardt, M. (2010) Reduced EBF expression underlies loss of B-cell potential of hematopoietic progenitors with age. *Aging Cell* **9**, 410-419
36. Miller, J. P., and Allman, D. (2003) The decline in B lymphopoiesis in aged mice reflects loss of very early B-lineage precursors. *J Immunol* **171**, 2326-2330
37. Dias, S., Silva, H., Jr., Cumano, A., and Vieira, P. (2005) Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* **201**, 971-979
38. Hagman, J., and Lukin, K. (2005) Early B-cell factor 'pioneers' the way for B-cell development. *Trends Immunol* **26**, 455-461
39. Lin, H., and Grosschedl, R. (1995) Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* **376**, 263-267
40. Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* **401**, 556-562
41. Nechanitzky, R., Akbas, D., Scherer, S., Gyory, I., Hoyler, T., Ramamoorthy, S., Diefenbach, A., and Grosschedl, R. (2013) Transcription factor EBF1 is essential for the maintenance of B cell identity and prevention of alternative fates in committed cells. *Nat Immunol* **14**, 867-875
42. Malin, S., McManus, S., and Busslinger, M. (2010) STAT5 in B cell development and leukemia. *Curr Opin Immunol* **22**, 168-176
43. Morrison, S. J., and Scadden, D. T. (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327-334
44. Ding, L., and Morrison, S. J. (2013) Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231-235
45. Mourcin, F., Breton, C., Tellier, J., Narang, P., Chasson, L., Jorquera, A., Coles, M., Schiff, C., and Mancini, S. J. (2011) Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. *Blood* **117**, 6552-6561
46. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006) Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977-988
47. Kollet, O., Canaani, J., Kalinkovich, A., and Lapidot, T. (2012) Regulatory cross talks of bone cells, hematopoietic stem cells and the nervous system maintain hematopoiesis. *Inflamm Allergy Drug Targets* **11**, 170-180
48. Garvy, B. A., King, L. E., Telford, W. G., Morford, L. A., and Fraker, P. J. (1993) Chronic elevation of plasma corticosterone causes reductions in the number of cycling cells of the B lineage in murine bone marrow and induces apoptosis. *Immunology* **80**, 587-592
49. Kollet, O., Vagima, Y., D'Uva, G., Golan, K., Canaani, J., Itkin, T., Gur-Cohen, S., Kalinkovich, A., Caglio, G., Medaglia, C., Ludin, A., Lapid, K., Shezen, E., Neufeld-Cohen, A., Varol, D., Chen, A., and Lapidot, T. (2013) Physiologic corticosterone oscillations regulate murine hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and CXCL12 expression by bone marrow stromal progenitors. *Leukemia* **27**, 2006-2015
50. Glaser, R., and Kiecolt-Glaser, J. K. (2005) Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* **5**, 243-251
51. Baek, K., Barlow, A. A., Allen, M. R., and Bloomfield, S. A. (2008) Food restriction and simulated microgravity: effects on bone and serum leptin. *J Appl Physiol (1985)* **104**, 1086-1093

52. Lew, P. S., Wong, D., Yamaguchi, T., Leckstrom, A., Schwartz, J., Dodd, J. G., and Mizuno, T. M. (2009) Tail suspension increases energy expenditure independently of the melanocortin system in mice. *Can J Physiol Pharmacol* **87**, 839-849
53. Momken, I., Stevens, L., Bergouignan, A., Desplanches, D., Rudwill, F., Chery, I., Zahariev, A., Zahn, S., Stein, T. P., Sebedio, J. L., Pujos-Guillot, E., Falempin, M., Simon, C., Coxam, V., Andrianjafiniony, T., Gauquelin-Koch, G., Picquet, F., and Blanc, S. (2011) Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. *Faseb J* **25**, 3646-3660
54. Weiskopf, D., Weinberger, B., and Grubeck-Loebenstein, B. (2009) The aging of the immune system. *Transpl Int* **22**, 1041-1050
55. Cancro, M. P., Hao, Y., Scholz, J. L., Riley, R. L., Frasca, D., Dunn-Walters, D. K., and Blomberg, B. B. (2009) B cells and aging: molecules and mechanisms. *Trends Immunol* **30**, 313-318
56. Allman, D., and Miller, J. P. (2005) The aging of early B-cell precursors. *Immunol Rev* **205**, 18-29
57. Kohler, A., Schmithorst, V., Filippi, M. D., Ryan, M. A., Daria, D., Gunzer, M., and Geiger, H. (2009) Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. *Blood* **114**, 290-298
58. Ergen, A. V., Boles, N. C., and Goodell, M. A. (2012) Rantes/Ccl5 influences hematopoietic stem cell subtypes and causes myeloid skewing. *Blood* **119**, 2500-2509
59. Geiger, H., de Haan, G., and Florian, M. C. (2013) The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol* **13**, 376-389
60. Sakata, T., Sakai, A., Tsurukami, H., Okimoto, N., Okazaki, Y., Ikeda, S., Norimura, T., and Nakamura, T. (1999) Trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice. *J Bone Miner Res* **14**, 1596-1604

Figure 1

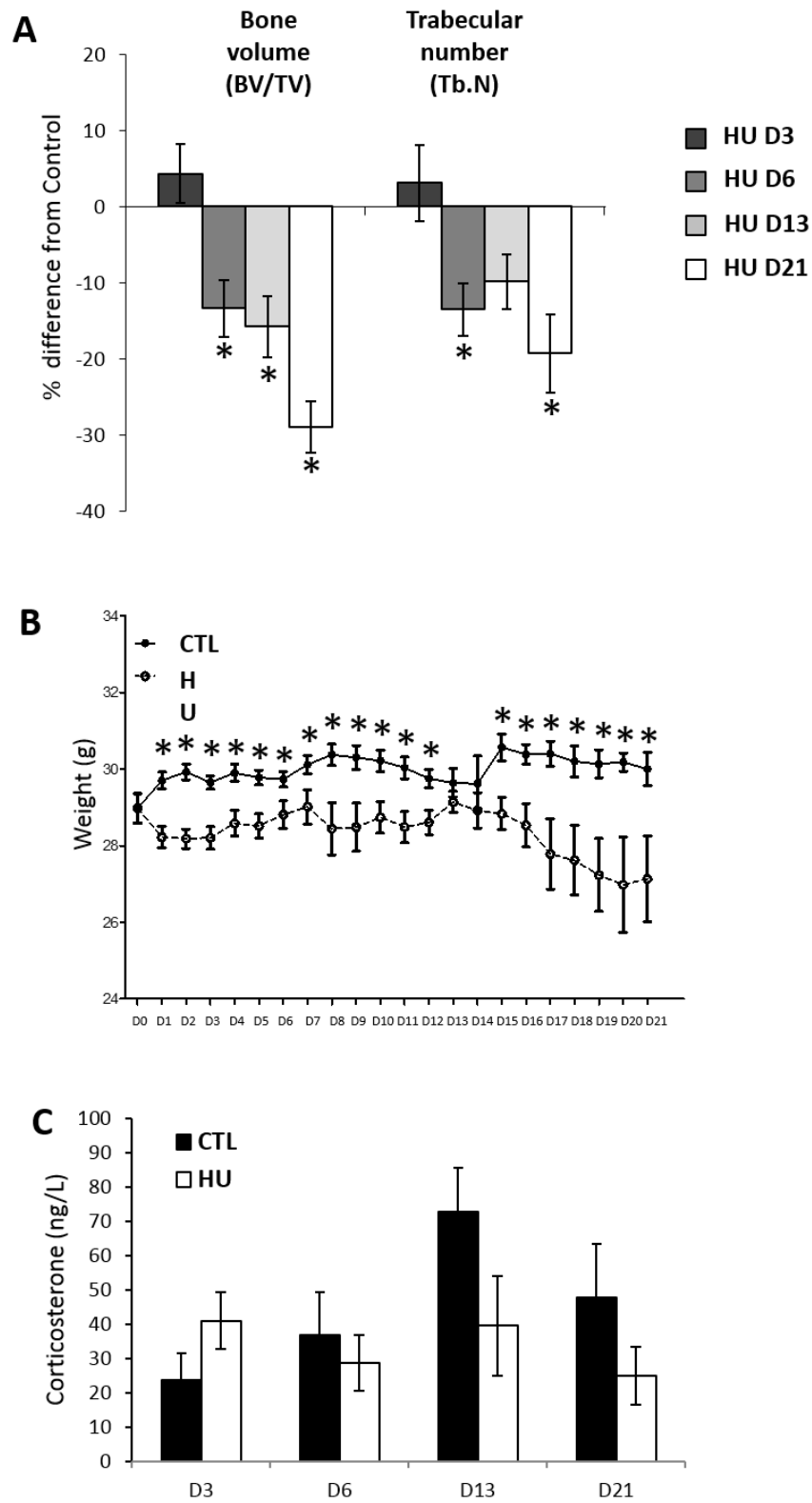


Figure 2

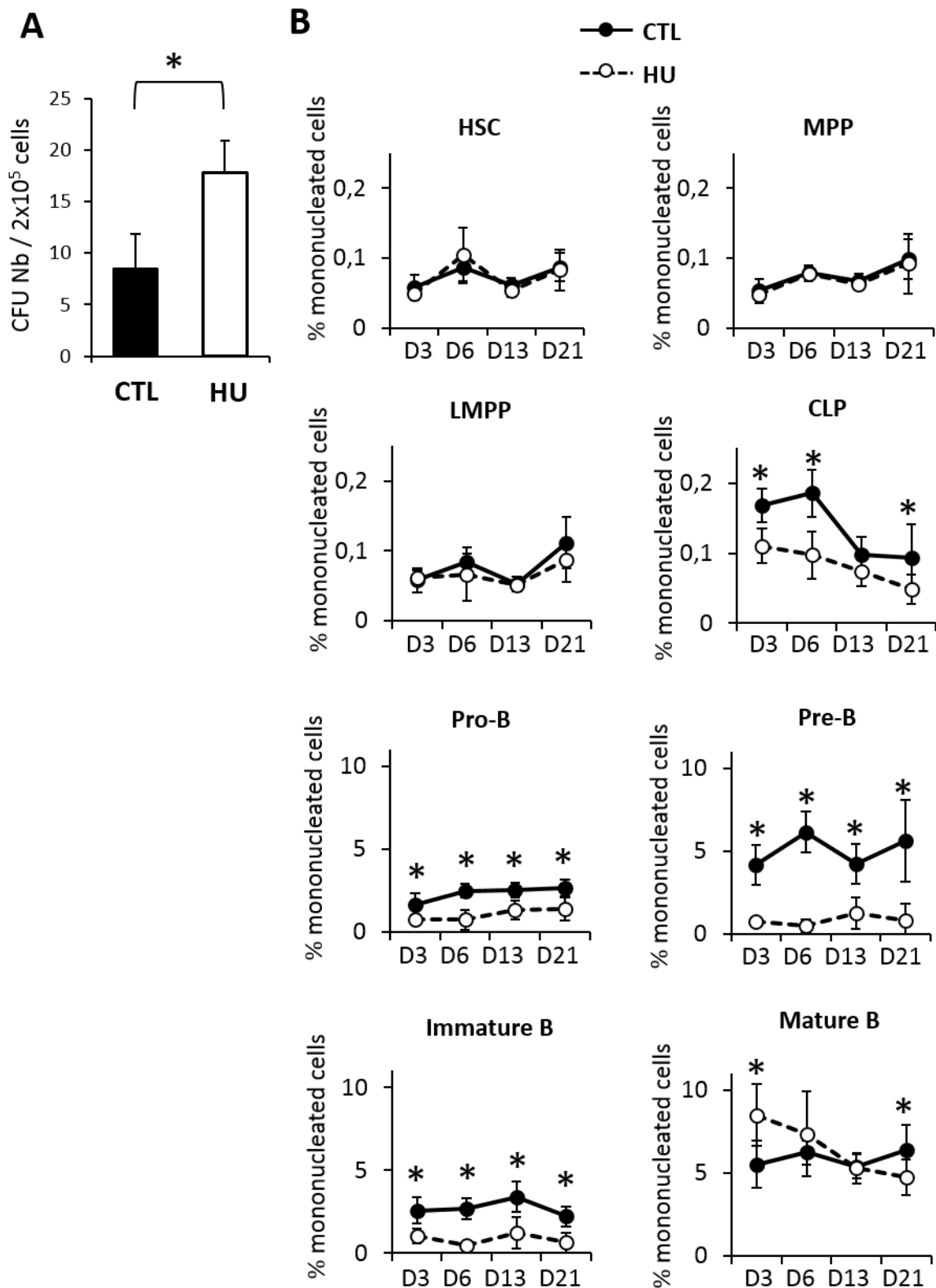


Figure 3

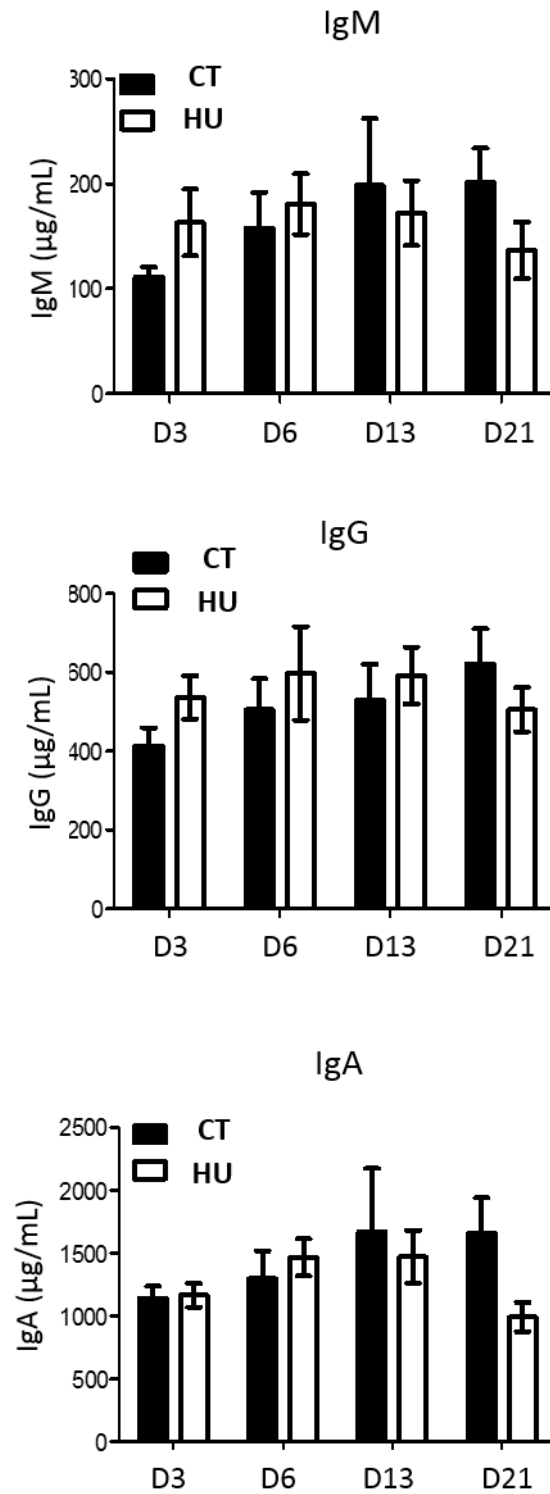


Figure 4

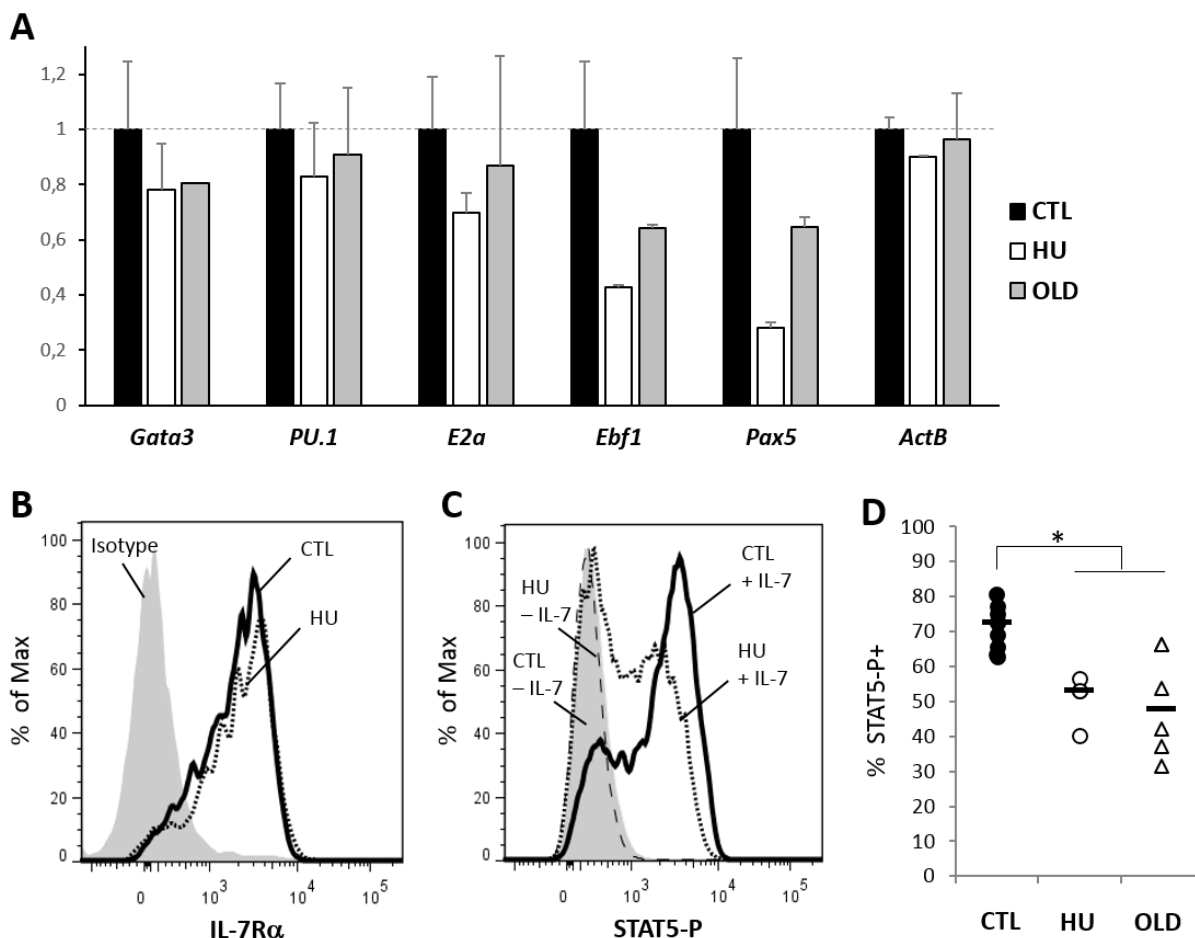
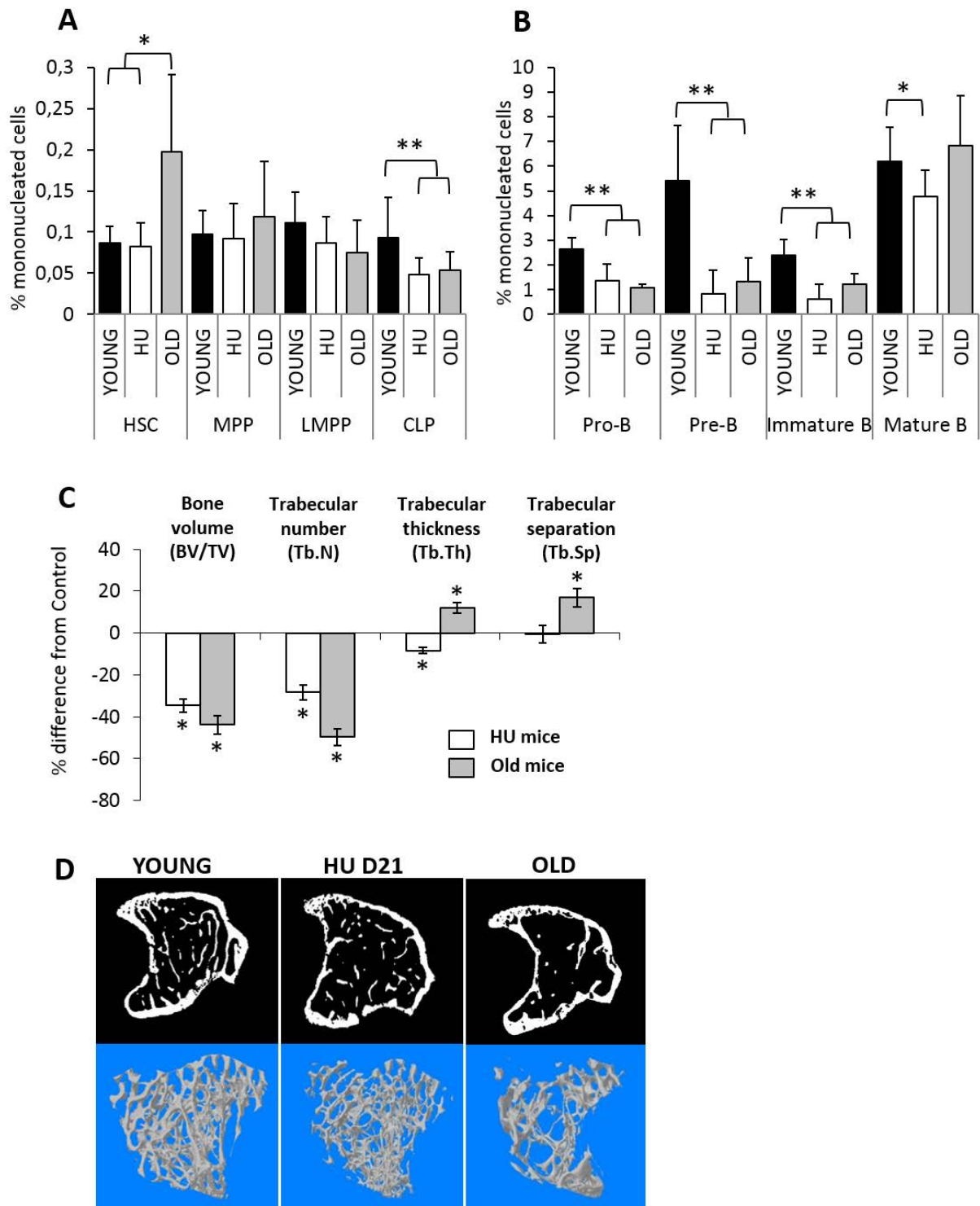


Figure 5



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kindt T, Goldsby R, Osborne B, Fridman C. 2008. Immunologie : Le cours de Janis Kuby avec questions de révision, 6ème Edition. Dunod.
2. Chatenoud L, Bach J-F. 2012. Immunologie, 6ème Edition. Médecine Sciences Publications / Lavoisier.
3. Revillard J-P. 2001. Immunologie. 4ème édition, De Boeck Supérieur.
4. Rothenberg EV. 2014. Transcriptional control of early T and B cell developmental choices. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 283–321.
5. Clark MR, Mandal M, Ochiai K, Singh H. 2014. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 69–80.
6. Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. 2007. [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Médecine Sci. MS.* **23**, 67–73.
7. Kawasaki K, Nogawa H, Nishijima M. 2003. Identification of mouse MD-2 residues important for forming the cell surface TLR4-MD-2 complex recognized by anti-TLR4-MD-2 antibodies, and for conferring LPS and taxol responsiveness on mouse TLR4 by alanine-scanning mutagenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* **170**, 413–20.
8. Minguet S, Dopfer EP, Pollmer C, Freudenberg MA, Galanos C, Reth M, Huber M, Schamel WW. 2008. Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2475–87.
9. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* **42**, 145–51.
10. Bernard C. 1865. Introduction à l'étude de la médecine expérimentale, 1ère Edition. Garnier-Flammarion.
11. Cannon W. 1935. Stresses and Strains of Homeostasis. *Am. J. Med. Sci.* **189**, 13–155.
12. Selye H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *Br. Med. J.* **1**, 1383–92.
13. Lazarus RS, DeLongis A, Folkman S, Gruen R. 1985. Stress and adaptational outcomes. The problem of confounded measures. *Am. Psychol.* **40**, 770–85.
14. Márquez C, Nadal R, Armario A. 2004. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience.* **123**, 601–12.
15. Adriaan Bouwknecht J, Olivier B, Paylor RE. 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.
16. Tafet GE, Bernardini R. 2003. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **27**, 893–903.
17. Shekhar A, Truitt W, Rainnie D, Sajdyk T. 2005. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress Amst. Neth.* **8**, 209–19.
18. Korte SM. 2001. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **25**, 117–42.
19. Gala RR. 1990. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci.* **46**, 1407–20.

20. Malarkey WB, Hall JC, Pearl DK, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. 1991. The influence of academic stress and season on 24-hour concentrations of growth hormone and prolactin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**, 1089–92.
21. Tomei F, Ciarrocca M, Cherubini E, Rosati MV, Monti C, Capozzella A, Tomei G. 2006. Prolactin levels in workers exposed to chemical, physical and psycho-social urban stressors. *J. Occup. Health.* **48**, 253–60.
22. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. 2005. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 243–51.
23. Marin MT, Cruz FC, Planeta CS. 2007. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol. Behav.* **90**, 29–35.
24. Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Tabira T. 2002. Saiko-ka-ryukotsu-borei-to, an herbal medicine, prevents chronic stress-induced disruption of glucocorticoid negative feedback in rats. *Life Sci.* **72**, 67–77.
25. Filaretova L, Morozova O, Laszlo F, Morschl E, Zelena D. 2013. Does chronic stress enhance the risk of diseases? *Endocr. Regul.* **47**, 177–88.
26. Koolhaas JM. 2008. Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain. Behav. Immun.* **22**, 662–7.
27. Harris RBS, Gu H, Mitchell TD, Endale L, Russo M, Ryan DH. 2004. Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. *Physiol. Behav.* **81**, 557–68.
28. Felten SY, Felten DL. 1991. Psychoneuroimmunology - The innervation of lymphoid tissue, (Ed R. Ader, D.L. Felten and N. Cohen). Academic Press. 27-69.
29. Calcagni E, 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.
30. Dhabhar FS, McEwen BS. 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1059–64.
31. Elenkov IJ, Chrousos GP. 1999. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* **10**, 359–68.
32. Elenkov IJ. 2004. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1024**, 138–46.
33. Lyte M, Nelson SG, Thompson ML. 1990. Innate and adaptive immune responses in a social conflict paradigm. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **57**, 137–47.
34. Brown DH, Sheridan J, Pearl D, Zwilling BS. 1993. Regulation of mycobacterial growth by the hypothalamus-pituitary-adrenal axis: differential responses of Mycobacterium bovis BCG-resistant and -susceptible mice. *Infect. Immun.* **61**, 4793–800.
35. Palermo-Neto J, de Oliveira Massoco C, Robespierre de Souza W. 2003. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain. Behav. Immun.* **17**, 43–54.
36. Atanackovic D, Schulze J, Kröger H, Brunner-Weinzierl MC, Deter HC. 2003. Acute psychological stress induces a prolonged suppression of the production of reactive oxygen species by phagocytes. *J. Neuroimmunol.* **142**, 159–65.

37. Mizobe K, Kishihara K, Ezz-Din El-Naggar R, Madkour GA, 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**, 81–9.
38. Sternberg EM. 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 318–28.
39. Hosoi J, Tsuchiya T, Denda M, Ashida Y, Takashima A, Granstein RD, Koyama J. 1998. Modification of LC phenotype and suppression of contact hypersensitivity response by stress. *J. Cutan. Med. Surg.* **3**, 79–84.
40. Zwilling BS, Brown D, Christner R, Faris M, Hilburger M, McPeck M, Van Epps C, Hartlaub BA. 1990. Differential effect of restraint stress on MHC class II expression by murine peritoneal macrophages. *Brain. Behav. Immun.* **4**, 330–8.
41. Jiang CG, Morrow-Tesch JL, Beller DI, Levy EM, Black PH. 1990. Immunosuppression in mice induced by cold water stress. *Brain. Behav. Immun.* **4**, 278–91.
42. Zwilling BS, Brown D, Pearl D. 1992. Induction of major histocompatibility complex class II glycoproteins by interferon-gamma: attenuation of the effects of restraint stress. *J. Neuroimmunol.* **37**, 115–22.
43. Moser M, De Smedt T, Sornasse T, Tielemans F, Chentoufi AA, Muraille E, Van Mechelen M, Urbain J, Leo O. 1995. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2818–24.
44. Kim M-H, Yang J-Y, Upadhaya SD, Lee H-J, Yun C-H, Ha JK. 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**, 151–7.
45. Morgado JM, Rama L, Silva I, de Jesus Inácio M, Henriques A, Laranjeira P, Pedreiro S, Rosado F, Alves F, Gleeson M, Pais ML, Paiva A, Teixeira AM. 2012. Cytokine production by monocytes, neutrophils, and dendritic cells is hampered by long-term intensive training in elite swimmers. *Eur. J. Appl. Physiol.* **112**, 471–82.
46. Rogers CJ, Brissette-Storkus CS, Chambers WH, Cameron JL. 1999. Acute stress impairs NK cell adhesion and cytotoxicity through CD2, but not LFA-1. *J. Neuroimmunol.* **99**, 230–41.
47. Bonneau RH, Sheridan JF, Feng NG, 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**, 170–92.
48. Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Chee M, Newton T, Cacioppo JT, Mao HY, Glaser R. 1993. Negative behavior during marital conflict is associated with immunological down-regulation. *Psychosom. Med.* **55**, 395–409.
49. Esterling BA, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. 1996. Psychosocial modulation of cytokine-induced natural killer cell activity in older adults. *Psychosom. Med.* **58**, 264–72.
50. Irwin M, Lacher U, Caldwell C. 1992. Depression and reduced natural killer cytotoxicity: a longitudinal study of depressed patients and control subjects. *Psychol. Med.* **22**, 1045–50.
51. Zivković I, Rakin A, Petrović-Djergović D, Miljković B, Mičić M. 2005. The effects of chronic stress on thymus innervation in the adult rat. *Acta Histochem.* **106**, 449–58.

52. Gust DA, Gordon TP, Wilson ME, Brodie AR, Ahmed-Ansari A, McClure HM. 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**, 189–99.
53. Stefanski V, Knopf G, Schulz S. 2001. Long-term colony housing in Long Evans rats: immunological, hormonal, and behavioral consequences. *J. Neuroimmunol.* **114**, 122–30.
54. Rinner I, Schauenstein K, Mangge H, Porta S, Kvetnansky R. 1992. Opposite effects of mild and severe stress on in vitro activation of rat peripheral blood lymphocytes. *Brain. Behav. Immun.* **6**, 130–40.
55. Shurin MR, Zhou D, Kusnecov A, Rassnick S, Rabin BS. 1994. Effect of one or more footshocks on spleen and blood lymphocyte proliferation in rats. *Brain. Behav. Immun.* **8**, 57–65.
56. Sonnenfeld G, Cunnick JE, Armfield AV, Wood PG, Rabin BS. 1992. Stress-induced alterations in interferon production and class II histocompatibility antigen expression. *Brain. Behav. Immun.* **6**, 170–8.
57. Dobbs CM, Feng N, Beck FM, Sheridan JF. 1996. Neuroendocrine regulation of cytokine production during experimental influenza viral infection: effects of restraint stress-induced elevation in endogenous corticosterone. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* **157**, 1870–7.
58. Glaser R, Pearson GR, Bonneau RH, Esterling BA, Atkinson C, Kiecolt-Glaser JK. 1993. Stress and the memory T-cell response to the Epstein-Barr virus in healthy medical students. *Health Psychol. Off. J. Div. Health Psychol. Am. Psychol. Assoc.* **12**, 435–42.
59. Glaser R, Kennedy S, Lafuse WP, Bonneau RH, Speicher C, Hillhouse J, Kiecolt-Glaser JK. 1990. Psychological stress-induced modulation of interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 production in peripheral blood leukocytes. *Arch. Gen. Psychiatry.* **47**, 707–12.
60. Elenkov IJ, Chrousos GP. 2002. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **966**, 290–303.
61. Kusnecov AV, Grotta LJ, Schmidt SG, Bonneau RH, Sheridan JF, Glaser R, Moynihan JA. 1992. Decreased herpes simplex viral immunity and enhanced pathogenesis following stressor administration in mice. *J. Neuroimmunol.* **38**, 129–37.
62. Fukui Y, Sudo N, Yu XN, Nukina H, Sogawa H, 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**, 211–7.
63. Silberman DM, Wald MR, Genaro AM. 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.
64. Fujiwara R, Orita K. 1987. The enhancement of the immune response by pain stimulation in mice. I. The enhancement effect on PFC production via sympathetic nervous system in vivo and in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* **138**, 3699–703.
65. Wood PG, Karol MH, Kusnecov AW, Rabin BS. 1993. Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats. *Brain. Behav. Immun.* **7**, 121–34.
66. Lysle DT, Cunnick JE, Rabin BS. 1990. Stressor-induced alteration of lymphocyte proliferation in mice: evidence for enhancement of mitogenic responsiveness. *Brain. Behav. Immun.* **4**, 269–77.

67. Glaser R, Mehl VS, Penn G, Speicher CE, Kiecolt-Glaser JK. 1986. Stress-associated changes in plasma immunoglobulin levels. *Int. J. Psychosom. Off. Publ. Int. Psychosom. Inst.* **33**, 41–2.
68. Zalzman S, Minkiewicz-Janda A, Richter M, Anisman H. 1988. Critical periods associated with stressor effects on antibody titers and on the plaque-forming cell response to sheep red blood cells. *Brain. Behav. Immun.* **2**, 254–66.
69. Moynihan JA, Ader R, Grotta LJ, Schachtman TR, Cohen N. 1990. The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain. Behav. Immun.* **4**, 1–12.
70. Kusnecov AW, Rabin BS. 1993. Inescapable footshock exposure differentially alters antigen- and mitogen-stimulated spleen cell proliferation in rats. *J. Neuroimmunol.* **44**, 33–42.
71. Godbout JP, Glaser R. 2006. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* **1**, 421–7.
72. Dorshkind K, Horseman ND. 2001. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **23**, 288–94.
73. De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, Lombardi G, Bellastella A. 2005. Prolactin and autoimmunity. *Pituitary.* **8**, 25–30.
74. Kooijman R, Hooghe-Peters EL, Hooghe R. 1996. Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the immune system. *Adv. Immunol.* **63**, 377–454.
75. Carreño PC, Jiménez E, Sacedón R, Vicente A, Zapata AG. 2004. Prolactin stimulates maturation and function of rat thymic dendritic cells. *J. Neuroimmunol.* **153**, 83–90.
76. Carreño PC, Sacedón R, Jiménez E, Vicente A, Zapata AG. 2005. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J. Neuroimmunol.* **160**, 135–45.
77. Biswas R, Roy T, Chattopadhyay U. 2006. Prolactin induced reversal of glucocorticoid mediated apoptosis of immature cortical thymocytes is abrogated by induction of tumor. *J. Neuroimmunol.* **171**, 120–34.
78. Otten U, Ehrhard P, Peck R. 1989. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 10059–63.
79. Williams D, Kuipers A, Mukai C, Thirsk R. 2009. Acclimation during space flight: effects on human physiology. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* **180**, 1317–23.
80. Porte Y, Morel J-L. 2012. Learning on Jupiter, learning on the Moon: the dark side of the G-force. Effects of gravity changes on neurovascular unit and modulation of learning and memory. *Front. Behav. Neurosci.* **6**, 64.
81. Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, Bueb J-L, Tschirhart E, Legrand-Frossi C, Fripiat J-P. 2009. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1027–38.
82. Kimzey SL, Johnson PC, Ritzman SE, Mengel CE. 1976. Hematology and immunology studies: the second manned Skylab mission. *Aviat. Space Environ. Med.* **47**, 383–90.
83. Fripiat J-P. 2013. Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. *Mol. Immunol.* **56**, 434–41.

84. Cohrs RJ, Mehta SK, Schmid DS, Gilden DH, Pierson DL. 2008. Asymptomatic reactivation and shed of infectious varicella zoster virus in astronauts. *J. Med. Virol.* **80**, 1116–22.
85. Mehta SK, Crucian BE, Stowe RP, Simpson RJ, Ott CM, Sams CF, Pierson DL. 2013. Reactivation of latent viruses is associated with increased plasma cytokines in astronauts. *Cytokine.* **61**, 205–9.
86. Mehta SK, Laudenslager ML, Stowe RP, Crucian BE, Sams CF, Pierson DL. 2014. Multiple latent viruses reactivate in astronauts during Space Shuttle missions. *Brain. Behav. Immun.*
87. Sonnenfeld G. 2002. The immune system in space and microgravity. *Med. Sci. Sports Exerc.* **34**, 2021–7.
88. Taylor GR. 1974. Space microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **28**, 121–37.
89. Hammond TG, Benes E, O'Reilly KC, Wolf DA, Linnehan RM, Taher A, Kaysen JH, Allen PL, Goodwin TJ. 2000. Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle. *Physiol. Genomics.* **3**, 163–73.
90. Tixador R, Gasset G, Eche B, Moatti N, Lapchine L, Woldringh C, Toorop P, Moatti JP, Delmotte F, Tap G. 1994. Behavior of bacteria and antibiotics under space conditions. *Aviat. Space Environ. Med.* **65**, 551–6.
91. Nickerson CA, Ott CM, Mister SJ, Morrow BJ, Burns-Keliher L, Pierson DL. 2000. Microgravity as a novel environmental signal affecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. *Infect. Immun.* **68**, 3147–52.
92. Wilson JW, Ott CM, 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, et al. 2007. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16299–304.
93. Tucker DL, Ott CM, Huff S, Fofanov Y, Pierson DL, Willson RC, Fox GE. 2007. Characterization of *Escherichia coli* MG1655 grown in a low-shear modeled microgravity environment. *BMC Microbiol.* **7**, 15.
94. Ichiki AT, Gibson LA, Jago TL, Strickland KM, Johnson DL, Lange RD, Allebban Z. 1996. Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 37–43.
95. Mills PJ, Meck JV, Waters WW, D'Aunno D, Ziegler MG. 2001. Peripheral leukocyte subpopulations and catecholamine levels in astronauts as a function of mission duration. *Psychosom. Med.* **63**, 886–90.
96. Shearer WT. 2001. Consequences of contamination of the spacecraft environment: immunologic consequences. *Gravitational Space Biol. Bull. Publ. Am. Soc. Gravitational Space Biol.* **14**, 7–14.
97. Rykova MP, Sonnenfeld G, Lesnyak AT, Taylor GR, Meshkov DO, Mandel AD, Medvedev AE, Berry WD, Fuchs BB, Konstantinova IV. 1992. Effect of spaceflight on natural killer cell activity. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985.* **73**, 196S – 200S.
98. Konstantinova IV, Rykova M, Meshkov D, Peres C, Husson D, Schmitt DA. 1995. Natural killer cells after ALTAIR mission. *Acta Astronaut.* **36**, 713–8.

99. Kaur I, Simons ER, Castro VA, Ott CM, Pierson DL. 2005. Changes in monocyte functions of astronauts. *Brain. Behav. Immun.* **19**, 547–54.
100. Ortega MT, Pecaut MJ, Gridley DS, Stodieck LS, Ferguson V, Chapes SK. 2009. Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985.* **106**, 548–55.
101. Cogoli A, Bechler B, Cogoli-Greuter M, Criswell SB, Joller H, Joller P, Hunzinger E, Müller O. 1993. Mitogenic signal transduction in T lymphocytes in microgravity. *J. Leukoc. Biol.* **53**, 569–75.
102. Sonnenfeld G. 1994. Effect of space flight on cytokine production. *Acta Astronaut.* **33**, 143–7.
103. Baqai FP, Gridley DS, Slater JM, Luo-Owen X, Stodieck LS, Ferguson V, Chapes SK, Pecaut MJ. 2009. Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *J. Appl. Physiol.* **106**, 1935–42.
104. Durnova GN, Kaplansky AS, Portugalov VV. 1976. Effect of a 22-day space flight on the lymphoid organs of rats. *Aviat. Space Environ. Med.* **47**, 588–91.
105. Chapes SK, Simske SJ, Sonnenfeld G, Miller ES, Zimmerman RJ. 1999. Effects of spaceflight and PEG-IL-2 on rat physiological and immunological responses. *J. Appl. Physiol.* **86**, 2065–76.
106. Pecaut MJ, Simske SJ, Fleshner M. 2000. Spaceflight induces changes in splenocyte subpopulations: effectiveness of ground-based models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**, R2072–8.
107. Mandel AD, Balish E. 1977. Effect of space flight on cell-mediated immunity. *Aviat. Space Environ. Med.* **48**, 1051–7.
108. Gridley DS, Slater JM, Luo-Owen X, Rizvi A, Chapes SK, Stodieck LS, Ferguson VL, Pecaut MJ. 2009. Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J. Appl. Physiol.* **106**, 194–202.
109. Ullrich O, Huber K, Lang K. 2008. Signal transduction in cells of the immune system in microgravity. *Cell Commun. Signal. CCS.* **6**, 9.
110. De Santo NG, Christensen NJ, Drummer C, Kramer HJ, Regnard J, Heer M, Cirillo M, Norsk P. 2001. Fluid balance and kidney function in space: introduction. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **38**, 664–7.
111. Taylor GR, Dardano JR. 1983. Human cellular immune responsiveness following space flight. *Aviat. Space Environ. Med.* **54**, S55–9.
112. Taylor GR, Neale LS, Dardano JR. 1986. Immunological analyses of U.S. Space Shuttle crewmembers. *Aviat. Space Environ. Med.* **57**, 213–7.
113. Tauber S, Hauschild S, Crescio C, Secchi C, Paulsen K, Pantaleo A, Saba A, Buttron I, Thiel CS, Cogoli A, Pippia P, Ullrich O. 2013. Signal transduction in primary human T lymphocytes in altered gravity - results of the MASER-12 suborbital space flight mission. *Cell Commun. Signal. CCS.* **11**, 32.
114. Voss EW Jr. 1984. Prolonged weightlessness and humoral immunity. *Science.* **225**, 214–5.

115. Stowe RP, Sams CF, Mehta SK, Kaur I, Jones ML, Feedback DL, Pierson DL. 1999. Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 179–86.
116. Konstantinova IV, Rykova MP, Lesnyak AT, Antropova EA. 1993. Immune changes during long-duration missions. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 189–201.
117. Rykova MP, Antropova EN, Larina IM, Morukov BV. 2008. Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. *Acta Astronaut.* **63**, 697–705.
118. 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**, 905–10.
119. 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**, 1607–15.
120. Bascove M, Guéguinou N, Schaerlinger B, Gauquelin-Koch G, Frippiat J-P. 2011. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J.* **25**, 2947–55.
121. Huin-Schohn C, Guéguinou N, Schenten V, Bascove M, Koch GG, Baatout S, Tschirhart E, Frippiat J-P. 2013. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB J.* **27**, 333–41.
122. Morey-Holton E, Globus RK, 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.
123. Horowitz JM, Horwitz BA. 1978. Thermoregulatory responses of unanesthetized rats exposed to gravitational fields of 1 to 4g. *Life Sci. Space Res.* **16**, 77–82.
124. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. 1987. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl.)*. **93**, 358–64.
125. Pardon MC, Pérez-Díaz F, Joubert C, Cohen-Salmon C. 2000. Influence of a chronic ultramild stress procedure on decision-making in mice. *J. Psychiatry Neurosci. JPN.* **25**, 167–77.
126. Guéguinou N, Bojados M, Jamon M, Derradji H, Baatout S, Tschirhart E, Frippiat J-P, Legrand-Frossi C. 2012. Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice. *Psychoneuroendocrinology*. **37**, 137–47.
127. Leach CS, Inners LD, Charles JB. 1991. Changes in total body water during spaceflight. *J. Clin. Pharmacol.* **31**, 1001–6.
128. Vogel JM. 1975. Bone mineral measurement: Skylab experiment M-078. *Acta Astronaut.* **2**, 129–39.
129. Schneider V, Oganov V, LeBlanc A, Rakmonov A, Taggart L, Bakulin A, Huntoon C, Grigoriev A, Varonin L. 1995. Bone and body mass changes during space flight. *Acta Astronaut.* **36**, 463–6.
130. Morey ER, Sabelman EE, Turner RT, Baylink DJ. 1979. A new rat model simulating some aspects of space flight. *The Physiologist.* **22**, S23–4.

131. Sonnenfeld G. 1999. Space flight, microgravity, stress, and immune responses. *Adv. Space Res. Off. J. Comm. Space Res. COSPAR.* **23**, 1945–53.
132. Ilin EA, Novikov VE. 1980. [Stand for modelling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats]. *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.* **14**, 79–80.
133. Cogoli A. 1993. The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 259–68.
134. Wronski TJ, Li M, Shen Y, Miller SC, Bowman BM, Kostenuik P, Halloran BP. 1998. Lack of effect of spaceflight on bone mass and bone formation in group-housed rats. *J. Appl. Physiol.* **85**, 279–85.
135. Nash PV, Bour BA, Mastro AM. 1991. Effect of hindlimb suspension simulation of microgravity on in vitro immunological responses. *Exp. Cell Res.* **195**, 353–60.
136. Wang KX, Shi Y, Denhardt DT. 2007. Osteopontin regulates hindlimb-unloading-induced lymphoid organ atrophy and weight loss by modulating corticosteroid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14777–82.
137. O'Donnell PM, Orshal JM, Sen D, Sonnenfeld G, Aviles HO. 2009. Effects of exposure of mice to hindlimb unloading on leukocyte subsets and sympathetic nervous system activity. *Stress.* **12**, 82–8.
138. Kohno S, Yamashita Y, Abe T, Hirasaka K, Oarada M, Ohno A, Teshima-Kondo S, Higashibata A, Choi I, Mills EM, Okumura Y, Terao J, Nikawa T. 2012. Unloading stress disturbs muscle regeneration through perturbed recruitment and function of macrophages. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985.* **112**, 1773–82.
139. Felix K, Wise K, Manna S, Yamauchi K, Wilson BL, Thomas RL, Kulkarni A, Pellis NR, Ramesh GT. 2004. Altered cytokine expression in tissues of mice subjected to simulated microgravity. *Mol. Cell. Biochem.* **266**, 79–85.
140. Chapes SK, Mastro AM, Sonnenfeld G, Berry WD. 1993. Antiorthostatic suspension as a model for the effects of spaceflight on the immune system. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 227–35.
141. Wei LX, Zhou JN, Roberts AI, Shi YF. 2003. Lymphocyte reduction induced by hindlimb unloading: distinct mechanisms in the spleen and thymus. *Cell Res.* **13**, 465–71.
142. 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.
143. Morey-Holton ER, Globus RK. 2002. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.* **92**, 1367–77.
144. Bouzeghrane F, Somody L, Gallo-Bona N, Gauquelin-Koch G, Gharib C, Fagette S. 1999. Effect of a 14-day hindlimb suspension on beta-adrenoreceptors in rats. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **123**, 95–102.
145. Smolen JE, Fossett MC, Joe Y, Prince JE, Priest E, Kanwar S, Smith CW. 2000. Antiorthostatic suspension for 14 days does not diminish the oxidative response of neutrophils in mice. *Aviat. Space Environ. Med.* **71**, 1239–47.
146. Tsvirkun D, Bourreau J, Mieuset A, Garo F, Vinogradova O, Larina I, Navasiolava N, Gauquelin-Koch G, Gharib C, Custaud M-A. 2012. Contribution of social isolation, restraint, and hindlimb unloading to changes in hemodynamic parameters and motion activity in rats. *PLoS One.* **7**, e39923.

147. Choukèr A. 2012. Stress Challenges and Immunity in Space - From Mechanisms to Monitoring and Preventive Strategies, 1ère Edition. Springer-Verlag.
148. Wronski TJ, Morey-Holton ER. 1987. Skeletal response to simulated weightlessness: a comparison of suspension techniques. *Aviat. Space Environ. Med.* **58**, 63–8.
149. Momken I, Stevens L, Bergouignan A, Desplanches D, Rudwill F, Chery I, Zahariev A, Zahn S, Stein TP, Sebedio JL, Pujos-Guillot E, Falempin M, Simon C, Coxam V, Andrianjafiniony T, Gauquelin-Koch G, Picquet F, Blanc S. 2011. Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. *FASEB J.* **25**, 3646–60.
150. Flier JS. 1995. The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? *Cell.* **80**, 15–8.
151. Martin A, de Vittoris R, David V, Moraes R, Bégeot M, Lafage-Proust M-H, Alexandre C, Vico L, Thomas T. 2005. Leptin modulates both resorption and formation while preventing disuse-induced bone loss in tail-suspended female rats. *Endocrinology.* **146**, 3652–9.
152. Stein TP, Schluter MD, Leskiw MJ. 1999. Cortisol, insulin and leptin during space flight and bed rest. *J. Gravitational Physiol. J. Int. Soc. Gravitational Physiol.* **6**, P85–6.
153. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. 2009. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig. Dis. Sci.* **54**, 1847–56.
154. Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. 1996. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr. Biol. CB.* **6**, 1170–80.
155. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature.* **394**, 897–901.
156. Caren LD, Mandel AD, Nunes JA. 1980. Effect of simulated weightlessness on the immune system in rats. *Aviat. Space Environ. Med.* **51**, 251–5.
157. Erofeeva LM, Krasnov IB, Sapin MR. 2003. Structure and function of the thymus during adaptation of rats to hypergravitation. *Bull. Exp. Biol. Med.* **135**, 190–3.
158. 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**, 173–81.
159. Montez JM, Soukas A, Asilmaz E, Fayzikhodjaeva G, Fantuzzi G, Friedman JM. 2005. Acute leptin deficiency, leptin resistance, and the physiologic response to leptin withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2537–42.
160. Grove DS, Pishak SA, Mastro AM. 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**, 102–9.
161. Pecaut MJ, Nelson GA, Peters LL, Kostenuik PJ, Bateman TA, Morony S, Stodieck LS, Lacey DL, Simske SJ, Gridley DS. 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**, 2085–94.
162. Belay T, Aviles H, Vance M, Fountain K, Sonnenfeld G. 2002. Effects of the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions on resistance of mice to infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 262–8.

163. Lesnyak AT, Sonnenfeld G, Rykova MP, Meshkov DO, Mastro A, Konstantinova I. 1993. Immune changes in test animals during spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 214–26.
164. Cogoli A, Cogoli-Greuter M. 1997. Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity. *Adv. Space Biol. Med.* **6**, 33–79.
165. Boonyaratanakornkit JB, Cogoli A, Li C-F, Schopper T, Pippia P, Galleri G, Meloni MA, Hughes-Fulford M. 2005. Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J.* **19**, 2020–2.
166. Yamauchi K, Hales NW, Robinson SM, Niehoff ML, Ramesh V, Pellis NR, Kulkarni AD. 2002. Dietary nucleotides prevent decrease in cellular immunity in ground-based microgravity analog. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985.* **93**, 161–6.
167. Nash PV, Konstantinova IV, Fuchs BB, Rakhmilevich AL, Lesnyak AT, Mastro AM. 1992. Effect of spaceflight on lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. *J. Appl. Physiol.* **73**, 186S – 190S.
168. Crucian BE, Cubbage ML, Sams CF. 2000. Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. *J. Interferon Cytokine Res.* **20**, 547–56.
169. Sonnenfeld G, Miller ES. 1993. The role of cytokines in immune changes induced by spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 253–8.
170. Ahdjoudj S, Lasmoles F, Holy X, Zerath E, Marie PJ. 2002. Transforming growth factor beta2 inhibits adipocyte differentiation induced by skeletal unloading in rat bone marrow stroma. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **17**, 668–77.
171. Amblard D, Lafage-Proust M-H, Laib A, Thomas T, Rügsegger P, Alexandre C, Vico L. 2003. Tail suspension induces bone loss in skeletally mature mice in the C57BL/6J strain but not in the C3H/HeJ strain. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **18**, 561–9.
172. Sonnenfeld G. 2003. Animal models for the study of the effects of spaceflight on the immune system. *Adv. Space Res. Off. J. Comm. Space Res. COSPAR.* **32**, 1473–6.
173. Sonnenfeld G. 2005. Use of animal models for space flight physiology studies, with special focus on the immune system. *Gravitational Space Biol. Bull. Publ. Am. Soc. Gravitational Space Biol.* **18**, 31–5.
174. Gaignier F, Schenten V, De Carvalho Bittencourt M, Gauquelin-Koch G, Fripiat J-P, Legrand-Frossi C. 2014. Three weeks of murine hindlimb unloading induces shifts from B to T and from Th to Tc splenic lymphocytes in absence of stress and differentially reduces cell-specific mitogenic responses. *PLoS One.* **9**, e92664.
175. Dunn CD, Johnson PC, Lange RD, Perez L, Nessel R. 1985. Regulation of hematopoiesis in rats exposed to antiorthostatic, hypokinetic/hypodynamia: I. Model description. *Aviat. Space Environ. Med.* **56**, 419–26.
176. Vacek A, Michurina TV, Serova LV, Rotkovská D, Bartoníková A. 1991. Decrease in the number of progenitors of erythrocytes (BFUe, CFUe), granulocytes and macrophages (GM-CFC) in bone marrow of rats after a 14-day flight onboard the Cosmos-2044 Biosatellite. *Folia Biol. (Praha).* **37**, 35–41.
177. Sonnenfeld G, Mandel AD, Konstantinova IV, Berry WD, Taylor GR, Lesnyak AT, Fuchs BB, Rakhmilevich AL. 1992. Spaceflight alters immune cell function and distribution. *J. Appl. Physiol.* **73**, 191S – 195S.

178. Davis TA, Wiesmann W, Kidwell W, Cannon T, Kerns L, Serke C, Delaplaine T, Pranger A, Lee KP. 1996. Effect of spaceflight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myeloopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 69–76.
179. Ezura Y, Nagata J, Nagao M, Hemmi H, Hayata T, Rittling S, Denhardt DT, Noda M. 2014. Hindlimb-unloading suppresses B cell population in the bone marrow and peripheral circulation associated with OPN expression in circulating blood cells. *J. Bone Miner. Metab.*
180. Morrison SJ, Scadden DT. 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* **505**, 327–34.
181. Ding L, Morrison SJ. 2013. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature.* **495**, 231–5.
182. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* **25**, 977–88.
183. Mourcin F, Breton C, Tellier J, Narang P, Chasson L, Jorquera A, Coles M, Schiff C, Mancini SJC. 2011. Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. *Blood.* **117**, 6552–61.
184. Claycombe K, King LE, Fraker PJ. 2008. A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myeloopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2017–21.
185. Lin H, Grosschedl R. 1995. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature.* **376**, 263–7.
186. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. 1999. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature.* **401**, 556–62.
187. Dias S, Silva H, Cumano A, Vieira P. 2005. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* **201**, 971–9.
188. Hagman J, Lukin K. 2005. Early B-cell factor “pioneers” the way for B-cell development. *Trends Immunol.* **26**, 455–61.
189. Nechanitzky R, Akbas D, Scherer S, Györy I, Hoyler T, Ramamoorthy S, Diefenbach A, Grosschedl R. 2013. Transcription factor EBF1 is essential for the maintenance of B cell identity and prevention of alternative fates in committed cells. *Nat. Immunol.* **14**, 867–75.
190. Malin S, McManus S, Busslinger M. 2010. STAT5 in B cell development and leukemia. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 168–76.
191. Kollet O, Vagima Y, D’Uva G, Golan K, Canaani J, Itkin T, Gur-Cohen S, Kalinkovich A, Caglio G, Medaglia C, Ludin A, Lapid K, Shezen E, Neufeld-Cohen A, Varol D, Chen A, Lapidot T. 2013. Physiologic corticosterone oscillations regulate murine hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and CXCL12 expression by bone marrow stromal progenitors. *Leukemia.* **27**, 2006–15.
192. Garvy BA, King LE, Telford WG, Morford LA, Fraker PJ. 1993. Chronic elevation of plasma corticosterone causes reductions in the number of cycling cells of the B lineage in murine bone marrow and induces apoptosis. *Immunology.* **80**, 587–92.
193. Otero M, Lago R, Gomez R, Dieguez C, Lago F, Gómez-Reino J, Gualillo O. 2006. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **45**, 944–50.

194. Motyl KJ, Rosen CJ. 2012. Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis. *Biochimie*. **94**, 2089–96.
195. Lew PS, Wong D, Yamaguchi T, Leckstrom A, Schwartz J, Dodd JG, Mizuno TM. 2009. Tail suspension increases energy expenditure independently of the melanocortin system in mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **87**, 839–49.
196. Baek K, Barlow AA, Allen MR, Bloomfield SA. 2008. Food restriction and simulated microgravity: effects on bone and serum leptin. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*. **104**, 1086–93.
197. Blanc S, Somody L, Gharib C. 2000. Are energy metabolism alterations involved in cardiovascular deconditioning after weightlessness? An hypothesis. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* **441**, R39–47.
198. Sakata T, Sakai A, Tsurukami H, Okimoto N, Okazaki Y, Ikeda S, Norimura T, Nakamura T. 1999. Trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **14**, 1596–604.
199. Macho L, Kvetnansky R, Nemeth S, Fickova M, Popova I, Serova L, Grigoriev AI. 1996. Effects of space flight on endocrine system function in experimental animals. *Environ. Med. Annu. Rep. Res. Inst. Environ. Med. Nagoya Univ.* **40**, 95–111.
200. Goldstein O, Ishay JS. 1998. The white blood cell line: changes induced in mice by hypergravity. *Adv. Space Res. Off. J. Comm. Space Res. COSPAR.* **21**, 1333–43.
201. Grigorenko DE, Krasnov IB, Sapin MR. 2003. [Structural and functional organisation of the spleen lymphoid tissue after exposure to hypergravitation]. *Morfol. St. Petersburg Russ.* **123**, 60–4.
202. Pecaut MJ, Miller GM, Nelson GA, Gridley DS. 2004. Hypergravity-induced immunomodulation in a rodent model: hematological and lymphocyte function analyses. *J. Appl. Physiol.* **97**, 29–38.
203. 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**, 201–8.
204. Yuwaki K, Okuno M. 2004. Relationship between the stress of hyper-gravity and food intake and growth rate in mouse. *Uchū Seibutsu Kagaku.* **18**, 175–6.
205. Santucci D, Corazzi G, Francia N, Antonelli A, Aloe L, Alleva E. 2000. Neurobehavioural effects of hypergravity conditions in the adult mouse. *Neuroreport.* **11**, 3353–6.
206. Bouët V, Wubbels RJ, de Jong H a. A, Gramsbergen A. 2004. Behavioural consequences of hypergravity in developing rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **153**, 69–78.
207. 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.
208. Glaser R, MacCallum RC, Laskowski BF, Malarkey WB, Sheridan JF, Kiecolt-Glaser JK. 2001. Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **56**, M477–82.
209. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. 2008. Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviat. Space Environ. Med.* **79**, 835–43.

210. Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. **410**, 37–40.
211. Tulchinsky E. 2000. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol. Histopathol.* **15**, 921–8.
212. Tanos T, Marinissen MJ, Leskow FC, Hochbaum D, Martinetto H, Gutkind JS, Coso OA. 2005. Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light. *J. Biol. Chem.* **280**, 18842–52.
213. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. **11**, 115–22.
214. Oliver AM, Martin F, Gartland GL, Carter RH, Kearney JF. 1997. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2366–74.
215. Srivastava B, Quinn WJ, Hazard K, Erikson J, Allman D. 2005. Characterization of marginal zone B cell precursors. *J. Exp. Med.* **202**, 1225–34.
216. Meyer-Bahlburg A, Bandaranayake AD, Andrews SF, Rawlings DJ. 2009. Reduced c-myc expression levels limit follicular mature B cell cycling in response to TLR signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* **182**, 4065–75.
217. Honda K, Taniguchi T. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 644–58.
218. Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G. 2005. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res.* **15**, 407–22.
219. Ogata H, Su I, Miyake K, Nagai Y, Akashi S, Mecklenbräuer I, Rajewsky K, Kimoto M, Tarakhovskiy A. 2000. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J. Exp. Med.* **192**, 23–9.
220. Maes M. 2011. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **35**, 664–75.
221. You Z, Luo C, Zhang W, Chen Y, He J, Zhao Q, Zuo R, Wu Y. 2011. Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression. *Behav. Brain Res.* **225**, 135–41.
222. Willner P. 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl.)*. **134**, 319–29.
223. Moreau J-L, Scherschlicht R, Jenck F, Martin JR. 1995. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav. Pharmacol.* **6**, 682–7.
224. Cheeta S, Ruijt G, van Proosdij J, Willner P. 1997. Changes in sleep architecture following chronic mild stress. *Biol. Psychiatry.* **41**, 419–27.
225. Gorka Z, Moryl E, Papp M. 1996. Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**, 229–34.
226. Silberman DM, Ayelli-Edgar V, Zorrilla-Zubilete M, Zieher LM, Genaro AM. 2004. Impaired T-cell dependent humoral response and its relationship with T lymphocyte sensitivity to stress hormones in a chronic mild stress model of depression. *Brain. Behav. Immun.* **18**, 81–90.

227. Pardon M, Pérez-Diaz F, Joubert C, Cohen-Salmon C. 2000. Age-dependent effects of a chronic ultramild stress procedure on open-field behaviour in B6D2F1 female mice. *Physiol. Behav.* **70**, 7–13.
228. Negroni J, Venault P, Pardon MC, Pérez-Diaz F, Chapouthier G, Cohen-Salmon C. 2004. Chronic ultra-mild stress improves locomotor performance of B6D2F1 mice in a motor risk situation. *Behav. Brain Res.* **155**, 265–73.
229. Silberman DM, Wald M, Genaro AM. 2002. Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response. Participation of serum thyroid hormones and corticosterone. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 487–97.
230. Guan S, Liu J, Fang EF, Ng TB, Lian Y, Ge H. 2014. Chronic unpredictable mild stress impairs erythrocyte immune function and changes T-lymphocyte subsets in a rat model of stress-induced depression. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **37**, 414–22.
231. Kubera M, Basta-Kaim A, Holan V, Simbirtsev A, Roman A, Pigareva N, Prokopieva E, Sham J. 1998. Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL/6 mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **20**, 781–9.
232. Kioukia-Fougia N, Antoniou K, Bekris S, Liapi C, Christofidis I, Papadopoulou-Daifoti Z. 2002. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **26**, 823–30.
233. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* **382**, 250–2.
234. Frick LR, Rapanelli M, Cremaschi GA, Genaro AM. 2009. Fluoxetine directly counteracts the adverse effects of chronic stress on T cell immunity by compensatory and specific mechanisms. *Brain. Behav. Immun.* **23**, 36–40.
235. Robertson MJ, Schacterle RS, Mackin GA, Wilson SN, Bloomingdale KL, Ritz J, Komaroff AL. 2005. Lymphocyte subset differences in patients with chronic fatigue syndrome, multiple sclerosis and major depression. *Clin. Exp. Immunol.* **141**, 326–32.
236. Hernandez ME, Martinez-Fong D, Perez-Tapia M, Estrada-Garcia I, Estrada-Parra S, Pavón L. 2010. Evaluation of the effect of selective serotonin-reuptake inhibitors on lymphocyte subsets in patients with a major depressive disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* **20**, 88–95.
237. Song C, Halbreich U, Han C, Leonard BE, Luo H. 2009. Imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, and between Th1 and Th2 cytokines in depressed patients: the effect of electroacupuncture or fluoxetine treatment. *Pharmacopsychiatry.* **42**, 182–8.
238. Mormède C, Castanon N, Médina C, Moze E, Lestage J, Neveu PJ, Dantzer R. 2002. Chronic mild stress in mice decreases peripheral cytokine and increases central cytokine expression independently of IL-10 regulation of the cytokine network. *Neuroimmunomodulation.* **10**, 359–66.
239. Patel A. 2013. Review: the role of inflammation in depression. *Psychiatr. Danub.* **25 Suppl 2**, S216–23.
240. Momeni M, Ghorban K, Dadmanesh M, Hajebrahimi B, Khodadadi H, Hassanshahi G, Arababadi MK. 2014. Differential pattern of cytokine production by depressed medical students; evidence for involvement of cytokine network in pathology of depression. *Clin. Lab.* **60**, 435–40.

241. Viena TD, Banks JB, Barbu IM, Schulman AH, Tartar JL. 2012. Differential effects of mild chronic stress on cortisol and S-IgA responses to an acute stressor. *Biol. Psychol.* **91**, 307–11.
242. Kvietkauskaitė R, Vaicaitienė R, Mauricas M. 2014. The change in the amount of immunoglobulins as a response to stress experienced by soldiers on a peacekeeping mission. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* **87**, 615–22.
243. Bundgaard CJ, Kalliokoski O, Abelson KSP, Hau J. 2012. Acclimatization of mice to different cage types and social groupings with respect to fecal secretion of IgA and corticosterone metabolites. *Vivo Athens Greece.* **26**, 883–8.
244. Obayashi K. 2013. Salivary mental stress proteins. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **425**, 196–201.
245. Lescale C, Schenten V, Djeghloul D, Bennabi M, Gaignier F, Vandamme K, Strazielle C, Kuzniak I, Petite H, Dosquet C, Fripiat J-P, Goodhardt M. 2014. Hindlimb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. *FASEB J.* Sous presse.
246. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ. 1996. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14564–8.
247. Dias CC, Nogueira-Pedro A, Barbosa CMV, Ribeiro-Filho AC, Wasinski F, Araújo RC, de Oliveira VX, Miranda A, Paredes-Gamero EJ. 2013. Hematopoietic stem cell expansion caused by a synthetic fragment of leptin. *Peptides.* **50**, 24–7.
248. Denhardt DT, Noda M. 1998. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **30-31**, 92–102.
249. Nomura S, Takano-Yamamoto T. 2000. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **19**, 91–6.
250. Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. 1993. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit. Rev. Immunol.* **13**, 225–46.
251. Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt DT, Nifuji A, Ezura Y, Noda M. 2007. Osteopontin is required for mechanical stress-dependent signals to bone marrow cells. *J. Endocrinol.* **193**, 235–43.
252. Wang KX, Denhardt DT. 2008. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 333–45.
253. Shin SL, Cha JH, Chun MH, Chung JW, Lee MY. 1999. Expression of osteopontin mRNA in the adult rat brain. *Neurosci. Lett.* **273**, 73–6.
254. Ichikawa H, Itota T, Nishitani Y, Torii Y, Inoue K, Sugimoto T. 2000. Osteopontin-immunoreactive primary sensory neurons in the rat spinal and trigeminal nervous systems. *Brain Res.* **863**, 276–81.
255. Renkl AC, Wussler J, Ahrens T, Thoma K, Kon S, Uede T, Martin SF, Simon JC, Weiss JM. 2005. Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood.* **106**, 946–55.
256. Navarro J, Ruiz-Bravo A, Jiménez-Valera M, Gil A. 1996. Modulation of antibody-forming cell and mitogen-driven lymphoproliferative responses by dietary nucleotides in mice. *Immunol. Lett.* **53**, 141–5.

257. Nagafuchi S, Hachimura S, Totsuka M, Takahashi T, Goto M, Yajima T, Kuwata T, Habu S, 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.
258. Maldonado J, Navarro J, Narbona E, Gil A. 2001. The influence of dietary nucleotides on humoral and cell immunity in the neonate and lactating infant. *Early Hum. Dev.* **65 Suppl**, S69–74.
259. Hales NW, Yamauchi K, Alicea A, Sundaresan A, Pellis NR, Kulkarni AD. 2002. A countermeasure to ameliorate immune dysfunction in in vitro simulated microgravity environment: role of cellulanucleotide nutrition. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **38**, 213–7.
260. Kulkarni AD, Yamauchi K, Sundaresan A, Ramesh GT, Pellis NR. 2005. Countermeasure for space flight effects on immune system: nutritional nucleotides. *Gravitational Space Biol. Bull. Publ. Am. Soc. Gravitational Space Biol.* **18**, 101–2.
261. Burikhanov RB, Wakame K, Igarashi Y, Wang S, Matsuzaki S. 2000. Suppressive effect of active hexose correlated compound (AHCC) on thymic apoptosis induced by dexamethasone in the rat. *Endocr. Regul.* **34**, 181–8.
262. 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. N. Y. N.* **29**, 139–43.
263. Wang S, Welte T, Fang H, Chang G-JJ, Born WK, O'Brien RL, Sun B, Fujii H, Kosuna K, Wang T. 2009. Oral administration of active hexose correlated compound enhances host resistance to West Nile encephalitis in mice. *J. Nutr.* **139**, 598–602.
264. Yagita A, Maruyama S, Wakasugi S, Sukegawa Y. 2002. H-2 haplotype-dependent serum IL-12 production in tumor-bearing mice treated with various mycelial extracts. *Vivo Athens Greece.* **16**, 49–54.
265. 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**, 1437–44.
266. Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, Fabian TJ, Frye RF. 1999. DHEA and DHEA-S: a review. *J. Clin. Pharmacol.* **39**, 327–48.
267. Zhang Z, Araghi-Niknam M, Liang B, Inserra P, Ardestani SK, Jiang S, Chow S, Watson RR. 1999. Prevention of immune dysfunction and vitamin E loss by dehydroepiandrosterone and melatonin supplementation during murine retrovirus infection. *Immunology.* **96**, 291–7.
268. Radford DJ, Wang K, McNelis JC, Taylor AE, Hechenberger G, Hofmann J, Chahal H, Arlt W, Lord JM. 2010. Dehydroepiandrosterone sulfate directly activates protein kinase C-beta to increase human neutrophil superoxide generation. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* **24**, 813–21.
269. Fantuzzi G, Faggioni R. 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 437–46.
270. Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. 1997. Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes.* **46**, 1235–8.

271. Takeda S. 2005. Central control of bone remodeling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 697–9.
272. Reseland JE, Gordeladze JO. 2002. Role of leptin in bone growth: central player or peripheral supporter? *FEBS Lett.* **528**, 40–2.
273. Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. 2000. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell. Immunol.* **199**, 15–24.
274. Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, Weetman AP, Strasburger CJ, Ross RJ. 2001. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* **167**, 4593–9.
275. Chan JL, Bullen J, Stoyneva V, Depaoli AM, Addy C, Mantzoros CS. 2005. Recombinant methionyl human leptin administration to achieve high physiologic or pharmacologic leptin levels does not alter circulating inflammatory marker levels in humans with leptin sufficiency or excess. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 1618–24.
276. Csiszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, Pearson K, de Cabo R, Pacher P, Zhang C, Ungvari Z. 2009. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H13–20.
277. Ungvari Z, Labinskyy N, Mukhopadhyay P, Pinto JT, Bagi Z, Ballabh P, Zhang C, Pacher P, Csiszar A. 2009. Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H1876–81.
278. Delmas D, Lançon A, Colin D, Jannin B, Latruffe N. 2006. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr. Drug Targets.* **7**, 423–42.
279. Bavaresco L. 2003. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs Exp. Clin. Res.* **29**, 181–7.
280. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, et al. 2008. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* **8**, 157–68.
281. Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F. 2010. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC Physiol.* **10**, 11.
282. Rao LG, Mackinnon ES, Josse RG, Murray TM, Strauss A, Rao AV. 2007. Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausal women. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA.* **18**, 109–15.
283. Mills LM, Wilson H, Thies F. 2012. Lycopene inhibits lymphocyte proliferation through mechanisms dependent on early cell activation. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 1034–42.
284. Kuo C-L, Chen T-S, Liou S-Y, Hsieh C-C. 2014. Immunomodulatory effects of EGCG fraction of green tea extract in innate and adaptive immunity via T regulatory cells in murine model. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **36**, 364–70.
285. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH. 2006. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by

- (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 850–9.
286. Schlernitzauer A, Oiry C, Hamad R, Galas S, Cortade F, Chabi B, Casas F, Pessemesse L, Fouret G, Feillet-Coudray C, Cros G, Cabello G, Magous R, Wrutniak-Cabello C. 2013. Chicoric acid is an antioxidant molecule that stimulates AMP kinase pathway in L6 myotubes and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* **8**, e78788.
287. Kour K, Bani S. 2011. Augmentation of immune response by chicoric acid through the modulation of CD28/CTLA-4 and Th1 pathway in chronically stressed mice. *Neuropharmacology.* **60**, 852–60.
288. Pawlak W, Kedziora J, Zolynski K, Kedziora-Kornatowska K, Blaszczyk J, Witkowski P. 1998. Free radicals generation by granulocytes from men during bed rest. *J. Gravitational Physiol. J. Int. Soc. Gravitational Physiol.* **5**, P131–2.
289. Schmitt DA, Schaffar L, Taylor GR, Loftin KC, Schneider VS, Koebel A, Abbal M, Sonnenfeld G, Lewis DE, Reuben JR, Ferebee R. 1996. Use of bed rest and head-down tilt to simulate spaceflight-induced immune system changes. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **16**, 151–7.
290. Kim H, Iwasaki K, Miyake T, Shiozawa T, Nozaki S, Yajima K. 2003. Changes in bone turnover markers during 14-day 6 degrees head-down bed rest. *J. Bone Miner. Metab.* **21**, 311–5.
291. Gmünder FK, Baisch F, Bechler B, Cogoli A, Cogoli M, Joller PW, Maass H, Müller J, Ziegler WH. 1992. Effect of head-down tilt bedrest (10 days) on lymphocyte reactivity. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **604**, 131–41.

RÉSUMÉ

Les vols spatiaux affaiblissent le système immunitaire. Les objectifs de cette thèse étaient de déterminer, à l'aide de modèles terrestres, les conséquences d'une exposition à la micropesanteur simulée, l'hypergravité ou des stress chroniques ultra légers sur l'immunité humorale murine.

Nous avons ainsi montré que la suspension anti-orthostatique, qui mime certains effets de la micropesanteur, induit une diminution de 59% du nombre de lymphocytes B spléniques et une inversion du rapport entre lymphocytes B et T. L'affaiblissement de la lymphopoïèse B mis en évidence par la diminution du nombre de progéniteurs lymphoïdes et des cellules pré-B en est probablement la cause. De plus, la position anti-orthostatique entraîne, en l'absence de stress, une diminution de la réponse *in vitro* des lymphocytes B au LPS, plus importante que celle des lymphocytes T à la ConA, comme en hypergravité. Afin de déterminer les mécanismes responsables de la diminution de la réponse des lymphocytes B chez les souris hypergravitaires, les transcrits de gènes impliqués dans la voie TLR-4, le récepteur du LPS, ont été quantifiés. L'expression de plusieurs gènes de la voie MyD88-dépendante est augmentée après 21 jours d'hypergravité, mais aucune modification n'a été observée dans les lymphocytes B stimulés avec du LPS. Enfin, la contribution de stress chroniques ultra légers a été évaluée. Les proportions de lymphocytes spléniques ne sont pas affectées par ces stress. Par contre, le taux d'IgA sériques s'est révélé augmenté et une baisse des cytokines pro-inflammatoires de type Th1 a été observée comme chez les astronautes. Ainsi, ces stress n'expliquent pas complètement l'impact négatif des vols spatiaux sur l'immunité humorale.

Ces recherches sont importantes pour identifier la/les cause(s) de l'altération de l'immunité humorale en vol, afin de tester/développer des contremesures efficaces pour renforcer le système immunitaire des astronautes, mais également de personnes stressées ou âgées.

Mots clés : souris, lymphocytes, micropesanteur, hypergravité, stress.

ABSTRACT

Spaceflight weaken the immune system. The aims of this thesis were to determine the effects of exposure to simulated microgravity, hypergravity or chronic ultra-mild stress on murine humoral immunity, using ground-based models.

We were able to show that the anti-orthostatic suspension, that mimics some of the effects of microgravity, caused a 59% decrease of the number of splenic B cells and an inversion of the ratio between B and T lymphocytes. A decrease in B lymphopoiesis, as evidenced by the decrease of lymphoid progenitors and pre-B cells is likely the cause. Furthermore, we showed that the anti-orthostatic position, in the absence of stress, leads to a decreased *in vitro* response of B cells to LPS, more important than the one of T cells to ConA, as did hypergravity exposure. To determine the mechanisms responsible of the decreased response of B cells from hypergravity mice, transcripts encoding genes involved in the TLR-4 signaling pathway, the LPS receptor on B cells, have been quantified. The expression of several genes of the MyD88-dependent pathway was increased after 21 days of hypergravity, but no change was observed in B cells stimulated with LPS. Finally, the contribution of chronic ultra-mild stresses was evaluated. The proportions of splenic lymphocytes were not affected by these stresses. However, the levels of serum IgA were increased and those of Th1 pro-inflammatory cytokines were decreased, as in astronauts. Thus, these stresses do not fully explain the negative impact of spaceflight conditions on humoral immunity.

These researches are important to identify the cause(s) of spaceflight-associated impaired immunity in order to test/develop effective countermeasures to strengthen the immune system of astronauts, but also of stressed or elderly people.

Key words: mouse, lymphocytes, microgravity, hypergravity, stress.