HAL
open science

Effets de différents modèles de stress sur le développement lymphocytaire

Coralie Fonte

To cite this version:

Coralie Fonte. Effets de différents modèles de stress sur le développement lymphocytaire. Immunologie. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0185 . tel-01980748

HAL Id: tel-01980748

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01980748

Submitted on 3 Jun 2019

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par **Coralie FONTE**

Effets de différents modèles de stress sur le développement lymphocytaire

Soutenue le 29 novembre 2018

Membres du jury:

Rapporteurs:	**Mme Sophie EZINE**	**Directrice de recherche INSERM, UMR-S1151, UMR 8253, Université Paris Descartes, Paris**
	Mr Jean-Luc MOREL	**Chargé de Recherche CNRS, UMR 5293, Université de Bordeaux, Bordeaux**
Examinateurs:	**Mr Pascal REBOUL**	**Professeur des Universités, CNRS, UMR 7365, Université de Lorraine, Nancy**
	Mme Véronique JOLIOT	**Maître de conférences, CNRS, UMR 7216, Université Paris Diderot, Paris**
	Mr Jean-Pol FRIPPIAT	**Professeur des Universités, EA 7300, Université de Lorraine, Nancy (directeur de thèse)**
	Mme Stéphanie GHISLIN	**Docteur, Ingénieur d'étude, EA 7300, Université de Lorraine, Nancy (co-directeur de thèse)**

Membres invités:

Mme Guillemette GAUQUELIN-KOCH	**Docteur, Responsable des Sciences de la Vie, CNES, Paris**
Mme Anne VANET	**Professeur des Universités, CNRS, UMR 7592, Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, Paris**

EA 7300 « Stress, IMmunité, PAthogènes », Université de Lorraine, Faculté de Médecine de Nancy, 9 avenue de la forêt de Haye. F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy.

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre… »

(*Marie Curie*)

REMERCIEMENTS

Durant ma thèse, j'ai eu l'honneur de croiser la route de nombreuses personnes. Il est maintenant temps pour moi de remercier toutes celles et ceux qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce projet.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean-Pol Frippiat, mon directeur de thèse, sans qui tout cela n'aurait pas eu lieu. Je vous remercie sincèrement et du fond du cœur de m'avoir permis d'effectuer cette thèse et de m'avoir donné les moyens nécessaires pour la réaliser dans les meilleures conditions. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien que vous m'avez apporté tout au long de ma thèse. Ça a été un vrai honneur de travailler avec vous.

Merci également à Mme Sophie Ezine et Mr Jean-Luc Morel d'avoir accepté la charge d'être rapporteurs de cette thèse et Mr Pascal Reboul et Mme Véronique Joliot d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et d'avoir accepté d'être examinateurs. Je vous remercie d'avoir consacré votre temps à évaluer ce projet.

Je remercie également la Région Lorraine qui a accepté de co-financer mon projet de thèse ainsi que le centre national d'études spatiales (CNES), le ministère français de l'enseignement supérieur et de la recherche (MESR) ainsi que l'ED BioSE et l'Université de Lorraine pour le soutien qu'ils apportent à l'unité. Je remercie Laurence Lanfumey et son équipe pour leur accueil lors de nos missions parisiennes. Merci aussi aux membres de la plateforme de cytométrie en flux de l'institut Jacques Monod et Huguette LOUIS de la plateforme de cytométrie en flux de l'Université de Lorraine pour leur aide, leur gentillesse et leur disponibilité.

Je tiens également à remercier le Docteur Stéphanie Ghislin de m'avoir co-encadré pour ce projet. Ça fait maintenant 5 ans que tu me supportes, depuis mon stage de M2. Je me rends compte que ça n'a pas toujours été facile pour toi de tout m'apprendre alors que j'étais totalement novice en la matière. Grâce à toi je suis devenue la reine de la qPCR ! Je t'ai donné du fil à retordre pendant toutes ces années, entre mes « j'ai fait une erreur, tout est foutu ! on arrête tout ! » et mes « Steph ? j'ai une question… », mais tu n'as pas lâché le morceau. Tu m'as énormément appris, tu m'as été d'une grande aide et d'un grand soutien à toute épreuve

et je t'en suis très reconnaissante. Ça n'a pas toujours été facile de communiquer entre mon patois Lorrain et tes explications techniques à n'en plus finir, mais on a toujours fini par se comprendre. Je n'oublierai pas ta bonne humeur, ton enthousiasme et tes deux mains gauches (je dirais aussi tes deux pieds gauches !) qui ont été l'objet de nombreux fous rires au labo. Tu m'as fait rire à tellement de reprises qu'il m'est impossible de dire quel serait le meilleur moment pour moi, mais je pourrais quand même citer le jour où t'es restée sous la douche de sécurité malgré toi, il y'a aussi la souris accrochée au bout de ton doigt ou encore les soirées zumba, … et j'en passe. Beaucoup t'ont surnommé le « Pierre Richard » du labo mais pour moi tu resteras avant tout « Maître Yoda » pour ta grande sagesse et ta patience. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi toutes ces années.

Merci également à Jérémy (alias « Sid ») et Julie, les deux frappés du labo. Julie, dès ton arrivée j'ai compris que t'étais « spéciale ». Avec tes affiches que t'as faites sur chacun d'entre nous (surtout celle de Steph en Yoda et moi en Luc), j'en rigole encore rien que d'y penser. Je repense encore à toutes les fois où on discutait calmement et que ça partait en cacahuète en 2 secondes pour finir en fou rire. Quant à toi Jéjé, je ne sais pas par où commencer. Je pourrais parler de ton régime hypercalorique que tu apprécies tant, de toutes tes histoires que tu nous as racontées sur toi qui nous ont fait mourir de rire, de toutes les fois où je voulais te mettre une baffe tellement tu m'énervais, de tes phrases préférées du genre « mes bébéééééééés » et « je suis tout petit », te toutes les fois où tu as détourné ce que l'on disait… enfin tout ceci pour dire que ton côté fou-fou m'a permis de décompresser au labo. C'était cool de pouvoir parler de tout et de rien avec toi qui est également thésard et qui traverse les mêmes choses que moi.

Merci aussi à toi Sandra pour tous tes conseils et ton aide que tu m'as apportés et merci d'avoir toujours accepté de nous prêter main-forte quand nous en avions besoin. Pour moi tu resteras le jukebox de musiques nulles qui restent dans la tête toute la journée. Je n'oublierai pas tes petits surnoms que tu m'as donné au cours de ces années, ça a commencé par « Gerflor » pendant mon M2 pour terminer par « Bulldog » pendant ma thèse. Eh oui la thèse ça change une personne§

Merci à Nassima et Guillaume, deux ex-membres du laboratoire. Nassima, merci pour tes conseils et d'avoir été mon GPS au laboratoire. On le sait tous que tu as toujours eu du mal à supporter les thésards du labo (surtout moi), mais je n'oublierai pas toutes nos chamailleries et nos délires qu'on a pu avoir. Guillaume, quant à toi, comment oublier son premier encadrant de

stage ? Je t'en ai fait baver avec les qPCR mais tu vois j'y suis arrivée. Je n'oublierai pas tous ces moments de rires que l'on a eus ensemble, ça a été un vrai plaisir de travailler avec vous deux.

Je remercie également Armelle pour toutes nos longues discussions scientifiques et non scientifiques que l'on a eues. Merci à Lisiane pour votre écoute, votre gentillesse et votre bonne humeur. Merci à Marine, autre thésarde du laboratoire, pour ta GRANDE gentillesse et pour toutes les fois où on a discuté de notre thèse et où on s'est rassurée (ou pas) sur notre avenir, grâce à toi je me suis sentie moins seule dans la panade. Je ne peux pas citer tout le monde mais je remercie évidemment toutes les autres personnes du laboratoire SIMPA pour leurs conseils et leur écoute notamment lors de nos réunions de labo.

Les membres du labo n'ont pas été les seuls à me soutenir dans cette grande aventure. Merci à tous mes amis, Boileau, Océ', Madison, Amel, les « garçons de la caverne » Crack, Doudou et tous les autres pour toutes nos soirées, nos fous rires, votre écoute, nos discussions où l'on refaisait le monde autour d'un verre. Merci de m'avoir permis de penser à autre chose pendant ma thèse. Merci aussi à toi mon petit Mosby pour toutes les fois où tu m'as fait rire et toutes les traces que tu as laissées derrière toi, merci pour ces moments de joie.

Un grand merci à ma moitié, Gama, pour avoir réussi à me supporter ces quatre dernières années et m'avoir soutenue dans les bons et les mauvais moments. Ça n'a pas été tous les jours facile mais tu m'as apporté le réconfort et le soutien dont j'avais besoin. J'espère vivre bien d'autres grandes aventures avec toi. Merci également à mes beaux-parents qui m'ont également soutenu tout au long de ma thèse.

Un grand merci au reste de la famille, oncles, tantes, cousins, cousines et tous les autres (car la famille est très grande), pour votre écoute, votre attention et votre immense soutien. Merci également à mes grands-parents maternels qui essaient encore aujourd'hui de comprendre ce que je fais. J'ai également une énorme pensée à mes grands-parents paternels, Papa-Antoine et Maman-Yolande, qui ne sont plus là aujourd'hui mais qui auraient été très fiers de moi, je pense très fort à vous deux.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents, sans qui je n'aurais pas réussi. Vous m'avez toujours poussée à donner le meilleur de moi-même. C'est grâce à vos encouragements,

votre soutien inconditionnel et votre confiance en moi que je suis arrivée ici aujourd'hui. Vous avez toujours su me remonter le moral et même parfois les bretelles quand j'en avais besoin. Vous dites souvent que vous êtes fiers de moi, mais moi aussi je peux vous dire que je suis fière d'avoir des parents en or comme vous. Cette thèse je vous la dois et je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci aussi à toi Antoine, mon petit frère préféré, pour toutes les bêtises que t'as pu faire ou dire (et que tu feras encore !) qui m'ont bien fait rire et m'ont remonté le moral quand je ne l'avais plus. Merci aussi pour toutes nos discussions et pour nos ballades que l'on a faites pour attraper des Pokémons. Je suis fière d'avoir un frangin comme toi, tu iras loin dans la vie. Merci du fond du cœur à vous trois d'être toujours là pour moi.

Un grand merci à tous ceux que j'aurais pu oublier, qui m'ont encouragée et soutenue durant cette grande aventure.

Coralie

RESUME

Les vols spatiaux sont source de nombreux stress conduisant à un affaiblissement du système immunitaire. L'efficacité de ce système repose notamment sur la diversité des répertoires de récepteurs aux antigènes présents à la surface des lymphocytes B (BCR) et T (TCR) permettant de reconnaitre un grand nombre d'antigènes différents.

Au cours de cette thèse, j'ai étudié la diversité des récepteurs à l'antigène dans trois modèles animaux différents : l'amphibien *Pleurodeles waltl*, le modèle murin de suspension anti-orthostatique (micropesanteur simulée) et le modèle murin CUMS (pour « Chronic Unpredictable Mild Socio-environmental stressors ») qui fait appel à des stress sociaux et environnementaux chroniques similaires à ceux rencontrés lors des vols spatiaux.

L'étude des répertoires de chaînes lourdes d'anticorps IgM et IgY de *P. waltl* a montré que ceux-ci présentent une diversité importante, faisant de cet animal un bon modèle pour étudier les effets d'un vol spatial sur le système immunitaire humoral.

Nous avons aussi montré que l'exposition à la suspension anti-orthostatique durant 21 jours diminue la lymphopoïèse B mais n'affecte que modérément la diversité du répertoire de chaînes lourdes d'IgM. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec des souris âgées afin de savoir si la suspension anti-orthostatique induit un vieillissement accéléré du système immunitaire. Même si nous avons noté des similitudes intéressantes entre ces deux groupes de souris, nous avons constaté que l'effet du vieillissement sur le répertoire d'IgM est plus important que celui de la suspension anti-orthostatique, suggérant que le temps d'exposition au modèle anti-orthostatique devrait être augmenté pour accentuer ses effets sur le répertoire d'anticorps.

Quant au modèle CUMS, nous avons montré que son application durant la gestation n'impacte pas la lymphopoïèse T chez les souriceaux nouveau-nés mais affecte 25% de leur répertoire de chaînes lourdes β du TCR. Ces résultats suggèrent que des stress socio-environnementaux chroniques, même de faibles intensités, pourraient modifier les capacités de reconnaissance antigénique de l'hôte.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS **5**

CHAPITRE I : INTRODUCTION **9**

1- LE SYSTEME IMMUNITAIRE **10**

1.1- Généralités 10

1.1.1- Définition 10

1.1.2- Le système immunitaire inné et adaptatif 10

1.1.2.1- Le système immunitaire inné 11

1.1.2.2- Le système immunitaire adaptatif 12

A- Les lymphocytes, acteurs du système immunitaire adaptatif *13*

A.1- Les lymphocytes T *13*

A.2- Les lymphocytes B *15*

B- Reconnaissance antigénique et réponse immunitaire *16*

1.2- Le système immunitaire adaptatif : récepteurs spécifiques de l'antigène 17

1.2.1- Les récepteurs à l'antigène des lymphocytes 17

1.2.1.1- Le récepteur à l'antigène des lymphocytes T 17

1.2.1.2- Le récepteur à l'antigène des lymphocytes B 19

1.2.2- La recombinaison V(D)J : processus de création du répertoire des récepteurs à l'antigène 20

1.2.2.1- Aspects génétiques 20

1.2.2.2- Choix des segments V, D et J 21

1.2.2.3- Mécanismes moléculaires de la recombinaison V(D)J 22

A- Initiation de la recombinaison V(D)J *23*

B- Recrutement du système de réparation NHEJ *24*

C- Création de la diversité de jonction *25*

D- Finalisation de la réparation des brins d'ADN et expression des récepteurs à l'antigène *26*

1.2.2.4- Régulation de la recombinaison V(D)J 26

A- Règle 12/23 et séquences RSS *26*

B- Régulation transcriptionnelle des protéines RAGs *27*

C- Accessibilité du locus et remodelage de la chromatine *28*

D- Exclusion allélique *30*

1.2.3- Origine et maturation des lymphocytes 31

1.2.3.1- Origine embryonnaire des lymphocytes 31

1.2.3.2- Lieu de développement des lymphocytes : Organes lymphoïdes primaires 32

A- La moelle osseuse *32*

B- Le thymus *33*

1.2.3.3- La lymphopoïèse T 33

A- Les stades de développement *33*

B- Les sous-populations doubles négatives et l'évolution de leur phénotype au cours de la lymphopoïèse T *34*

C- Les étapes de la recombinaison V(D)J au cours de la lymphopoïèse T *35*

D- Les régulateurs de la lymphopoïèse T *35*

E- Les phases de sélections *37*

E.1- La β sélection *37*

E.2- Les sélections positive et négative *38*

E.2.1- Sélection positive *39*

E.2.2- Sélection négative *40*
F- La tolérance périphérique *42*
1.2.3.4- Lymphopoïèse B 42
A- Stades de développement *42*
B- Modification du phénotype au cours de la lymphopoïèse B *44*
C- Les différents régulateurs de la lymphopoïèse B *45*
D- Les sélections positive et négative des LB *47*
D.1- Sélection positive via le pré-BCR *47*
D.2- Sélection négative des cellules B immatures *48*

2- IMPACTS DU STRESS SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE 49
2.1- Le stress 49
2.1.1- Définition 50
2.1.2- Quelques chiffres 51
2.2- Mécanismes physiologiques de la réponse au stress 52
2.2.1- Activation du système sympathique 52
2.2.2- Activation de l'axe corticotrope ou HHS 53
2.2.2.1- Organisation fonctionnelle de l'axe corticotrope 53
2.2.2.2- Les récepteurs aux glucocorticoïdes 54
2.2.2.3- Mode d'action des GR 54
2.2.2.4- Régulation de l'axe corticotrope 55
2.3- Impacts du stress chronique sur l'organisme 56
2.3.1- Impacts du stress en fonction du sexe 57
2.3.2- Impacts du stress en fonction de l'âge 58
2.4- Impacts du stress chronique sur le système immunitaire 59
2.4.1- Communication bidirectionnelle entre le système immunitaire et le système nerveux central ... 59
2.4.2- Effets du stress chronique sur le système immunitaire inné 60
2.4.3- Effets du stress sur le système immunitaire adaptatif 61
2.4.3.1- Effets du stress sur les lymphocytes T 61
2.4.3.2- Effets du stress sur les lymphocytes B 62
2.4.4- Effets du stress sur le système immunitaire fœtal 63

3- EFFETS DES VOLS SPATIAUX SUR LE CORPS HUMAIN 64
3.1- Stress subits lors des vols spatiaux 64
3.2- Effets des vols spatiaux sur l'organisme 65
3.3- Effets des vols spatiaux sur le système immunitaire 67
3.3.1- Effets des vols spatiaux sur le système immunitaire inné 68
3.3.2- Effets des vols spatiaux sur le système immunitaire adaptatif 69
3.3.2.1- Effets sur les lymphocytes T 69
3.3.2.2- Effets sur les lymphocytes B 70

4- OBJECTIFS 71
4.1- Premier objectif : Etude du répertoire d'anticorps de P.waltl 72
4.2- Deuxième objectif : Effets de stress chroniques socio-environnementaux imprévisibles sur la lymphopoïèse T et le répertoire TCRβ 73
4.3- Troisième objectif : Effets de l'hypokinésie des membres postérieurs et du vieillissement sur la diversité du répertoire BCR murin 74

CHAPITRE II : ETUDE DU REPERTOIRE D'ANTICORPS DE P.waltl 76

1- INTRODUCTION 77

2- RESULTATS ET DISCUSSION 77
2.1- Diversité du répertoire de chaînes lourdes d'IgY et d'IgM chez P.waltl 77
2.1.1- Identification et utilisation des sous-groupes IGHV, IGHJ et IGHD chez P.waltl 78
2.1.2- Etude des régions CDR de chaînes lourdes d'IgM et d'IgY 79
2.2- Caractéristiques du répertoire de chaînes lourdes d'IgY et d'IgM de P. waltl 80

3- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 81

CHAPITRE III : EFFETS DE STRESS CHRONIQUES SOCIO-ENVIRONNEMENTAUX IMPREVISIBLES SUR LA LYMPHOPOÏESE T ET LE REPERTOIRE TCRβ MURIN 83

1- INTRODUCTION 84

2- RESULTATS ET DISCUSSION 84
2.1- Effets du modèle CUMS sur l'état de stress des souriceaux et sur la lymphopoïèse T 84
2.2- Impacts du modèle CUMS sur le répertoire TCRβ des souriceaux 85
2.3- Effets du modèle CUMS sur les effecteurs de la recombinaison V(D)J 86
2.4- Impacts potentiels des modifications du répertoire mineur sur l'immunité de l'hôte 87

3- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 88

CHAPITRE IV : EFFETS DE L'HYPOKINESIE DES MEMBRES POSTERIEURS ET DU VIEILLISSEMENT SUR LA DIVERSITE DU REPERTOIRE BCR MURIN 90

1- INTRODUCTION 91
1.1- Le modèle HU : un modèle animal validé pour étudier les modifications physiologiques engendrées par les vols spatiaux 91
1.2- Effets du modèle HU sur le système immunitaire adaptatif 91
1.3- Objectifs de l'étude : Le modèle HU peut-il être considéré comme un modèle d'immunosénescence ? 92

2- MATERIELS ET METHODES 93
2.1- Animaux 93
2.2- Suspension anti-orthostatique 94
2.3- Recueil des échantillons 94
2.4- Quantification de la corticostérone 95
2.5- Cytométrie en flux 95
2.6- Transcription inverse et PCR quantitative 95
2.7- Séquençage Illumina 96
2.8- Logiciel dédié à l'analyse de séquences VDJ 97
2.9- Statistiques 97
2.10- Indices de dissimilarité 97

3- RESULTATS 98
3.1- Evaluation du stress chez les souris HU et âgées 98
3.2- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur la lymphopoïèse B 99
3.3- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur l'expression des effecteurs de la recombinaison V(D)J 99
3.4- Etude du répertoire BCR 100
3.4.1- Etude des effecteurs de la recombinaison V(D)J 101
3.4.1.1- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur la précision de coupure des protéines RAGs 101

3.4.1.2- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur l'ajout de nucléotides non génomiques dans les jonctions VH-D et D-JH 103
3.4.1.3- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le nombre de nucléotides palindromiques engendré par l'activité d'Artemis 104
3.4.2- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le répertoire BCR 104
3.4.2.1- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le choix des segments VH 105
3.4.2.2- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le choix des segments D 106
3.4.2.3- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le choix des segments JH 107
3.4.2.4- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur la longueur des CDR3 . 107
3.5- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le remodelage chromatinien au cours de la lymphopoïèse B 108
3.5.1- Pax5 et H3K9me2 108
3.5.2- EZH2 et H3K27me3 109

4- DISCUSSION 111
4.1- Impacts du modèle HU et du vieillissement sur le taux de corticostérone sérique 111
4.2- Impacts du vieillissement et du modèle HU sur la lymphopoïèse B 112
4.3- Impacts du vieillissement et du modèle HU sur le répertoire BCR 113
4.3.1- Vieillissement et recombinaison V(D)J 113
4.3.2- Modèle HU et recombinaison V(D)J 116
4.4- Le modèle HU peut-il être considéré comme un modèle de vieillissement accéléré de la lymphopoïèse B ? 116

5- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 117

CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 118

ANNEXES 125

RESUME CHAPITRE DE LIVRE **126**

CHAPITRE DE LIVRE **128**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 136

LISTE DES ABREVIATIONS

Les termes en anglais sont écrits en italique.

11β-HSD = 11 bêta hydroxystéroïde déshydrogénase

Ac = Anticorps

ACTH = Hormone hypophysaire adrénocorticotrope

ADN = Acide DésoxyriboNucléique

ADNc = ADN complémentaire

Ag = Antigène

ARN = Acide RibonNucléique

ARNm = ARN Messager

Axe HHS = axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien

BCR = Récepteur des cellules B

CD = Cluster de Différenciation

CDR = *Complementarity Determining Regions*

CMH I/II = Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I/II

CPA = Cellule(s) Présentatrice(s) d'Antigène

CRH = *Corticotropin-Releasing Hormone*

CSH = Cellules Souches Hématopoïétiques

cTEC = Cellules épithéliales corticales thymiques

CUMS = *Chronic Unpredictable Mild Socio-environmental Stressors* (stress chroniques socio-environnementaux imprévisibles)

DC = Cellule dendritique

DICS = Déficit Immunitaire Combiné Sévère

DN = Cellules T Double Négatives

DNA-PKcs = *DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit*

dNTP = DésoxyriboNucléotide TriPhosphate

DP = Cellules T Double Positives

E2A = *Early region 2A*

EBF =E*arly B cell Factor*

eEf2 = Eukaryotic E*longation Factor 2*

eIF3f = E*ukaryotic translation Initiation Factor 3 subunit f*

ELISA = *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

ERK = *Extracellular signal-regulated kinase*

Fab = F*ragment antigen binding*

FACS = *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (Cytométrie en flux)

Fas = *Apoptosis Stimulating Fragment*

FasL = Ligand de Fas

Fc = Fragment cristallisable

GAPDH = *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GR = Récepteur aux glucocorticoïdes

H = Heure

H2O up = Eau ultra pure

HMGB1/2 = *High Mobility Group Protein 1/2*

HU = *Hindlimb Unloading* (suspension anti-orthostatique ou hypokinésie des membres postérieurs)

IFN-γ = Interféron gamma

Ig = Immunoglobuline

IL = Interleukine

INRS = Institut National de la Recherche et de la Sécurité

ISS = Station spatiale internationale

ITAM = *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*

LB = Lymphocytes B

LB Fo = Lymphocytes B folliculaires

LB ZM = Lymphocytes B de la zone marginale

LT = Lymphocytes T

LTc = Lymphocytes T cytotoxiques

LTh = Lymphocytes T helper

MALT = *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*

MAPK = *Mitogen-Activated Protein Kinase* (protéine kinase activée par des mitogènes)

mg = Milligramme

min = Minute

mL = Millilitre

mM = Millimolaire

mTEC = Cellules médullaires épithéliales thymiques

NASA = *National Aeronautics and Space Administration*

NFκB = *Nuclear Factor-kappa B*

nGRE = Elément de réponse négatif des récepteurs aux glucocorticoïdes

NHEJ = *Non Homologous End Joining*

NK = *Natural Killer*

NR3C1 = *Nuclear Receptor subfamily 3 group C member 1*

OLP = Organe Lymphoïde Primaire

OLS = Organe Lymphoïde Secondaire

PAMPS = *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

Pax5 = *Paired box 5*

PCR = Réaction de polymérisation en chaîne

PE-Cy7 = *Phycoerythrin-Cyanine 7*

PI3K = *Phosphoinositide 3 kinase*

PLC = Cellules B Progénitrices Lymphoïdes Communes

PM = Cellules B Progénitrices Multipotentes

POMC = Pro-OpioMélanoCortine

Ppia = *Peptidylpropyl isomerase A*

PRR = *Pattern-Recognition Receptors*

qPCR = PCR quantitative en temps réel

RAG = Recombination *activating gene*

Rpl13 = *Ribosomal Protein L 13*

RSS = Séquences signales de recombinaison

RT = *Reverse Transcription*

SI = Système immunitaire

SNC = Système Nerveux Central

SP4 = Cellules T Simple Positive CD4+

SP8 = Cellules T Simple Positive CD8+

STAT-5 = *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*

TCM = Cellules T de mémoire centrale

TCR = Récepteur des cellules T

TdT = Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

TEM = Cellules T mémoires effectrices

TGFβ = *Tumor Growth Factor beta*

TNFα = *Tumor Necrosis Factor alpha*

Treg = T régulateur

TRM = Cellules T mémoires résidentes du tissu

µg = Microgramme

µL = Microlitre

µM = Micromolaire

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1- LE SYSTEME IMMUNITAIRE

1.1- Généralités

1.1.1- Définition

Le système immunitaire (SI) permet de protéger l'organisme contre les agressions physico-chimiques (comme une brûlure, des substances toxiques, etc…) et les agents pathogènes présents dans l'environnement (comme les virus, les bactéries, les champignons, les parasites, etc…). De manière remarquable, le SI est capable de distinguer des cellules ou molécules du « soi », c'est-à-dire qui sont propres à l'organisme, des cellules ou molécules du « non-soi », c'est-à-dire qui n'appartiennent pas à l'organisme. Cette reconnaissance du soi est permise par la présence de protéines membranaires ou antigènes (Ag) du soi, qui forment une sorte de « carte d'identité » spécifique à l'organisme. Tout agent différent du soi sera reconnu comme étranger et déclenchera l'activation du SI. Le SI est un système très complexe qui fait intervenir différents organes, cellules et molécules qui ne cessent d'interagir ensemble. Au cours de l'évolution, deux types de mécanismes de défense se sont développés, l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée, ou non spécifique, est la première ligne de défense. Son action est immédiate et se met en place dès l'entrée d'un agent étranger. La deuxième ligne de défense correspond à l'immunité adaptative ou spécifique. Son action n'est pas immédiate et nécessite un délai durant lequel les cellules immunitaires prennent connaissance des caractéristiques de l'Ag et se préparent à le détruire de manière spécifique.

1.1.2- Le système immunitaire inné et adaptatif

Le mécanisme de défense non spécifique, ou inné, est un mécanisme commun à l'ensemble du règne animal alors que le mécanisme de défense spécifique, ou adaptatif, est apparu exclusivement chez les gnathostomes (les vertébrés à mâchoire). Ces deux systèmes agissent en synergie pour neutraliser au mieux le pathogène entrant dans l'organisme. Ainsi, lors de la détection d'un agent pathogène, différents acteurs de la réponse immunitaire vont se mettre en place. Dans un premier temps vont intervenir les acteurs du SI inné et si l'immunité innée n'a pas suffi, ce seront les acteurs du SI adaptatif qui interviendront dans un second temps

Tableau 1: Principales fonctions des cellules appartenant au système immunitaire inné. (Topham and Hewitt 2009; Geissmann et al. 2010)

Cellules	Fonctions
Mastocyte	- Reconnaissance de molécules associées aux pathogènes (PAMPs) - Possède des granules contenant des médiateurs chimiques comme l'histamine impliqué dans la vasodilatation des vaisseaux sanguins facilitant l'arrivée d'autres cellules immunitaires sur le site de l'infection
Monocyte/Macrophage	- Le macrophage est la forme tissulaire du monocyte - Reconnaissance de molécules associées aux pathogènes (PAMPs) - Phagocyte les pathogènes ou cellules infectées - Stimule les autres cellules du système immunitaire inné
Polynucléaire neutrophile	- Reconnaissance molécules associées aux pathogènes (PAMPs) - Phagocyte les pathogènes
Cellule dendritique	- Reconnaissance de molécules associées aux pathogènes (PAMPs) - Phagocyte les pathogènes - Présente des peptides antigéniques à sa surface et migre vers les organes lymphoïdes secondaires pour activer la réponse immunitaire adaptative
Cellule tueuse naturelle (« Natural killer » ou NK)	- Reconnaissance des complexes majeurs d'histocompatibilité de type I (CMHI) modifiés à la surface des cellules infectées ou cancéreuses - Pouvoir cytotoxique via la sécrétion de protéines, comme la perforine, provoquant des altérations de la membrane cellulaire

1.1.2.1- Le système immunitaire inné

Le SI inné est la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Il agit de manière immédiate et non spécifique en réponse aux agressions. Il fait intervenir les barrières physiques de l'organisme telles que la peau, les muqueuses ou encore les larmes qui contiennent des lysozymes altérant la paroi de certaines bactéries (Turvey and Broide 2010). Si les pathogènes franchissent ces barrières physiques ils seront reconnus par les cellules dites sentinelles (macrophages, mastocytes, cellule NK (Natural Killer) et cellules dendritiques (ou DC)) qui patrouillent en permanence dans l'organisme afin de détecter et de répondre au plus vite à l'entrée d'un pathogène. Les cellules sentinelles vont recruter d'autres cellules du système immunitaires sur le site de l'infection, telles que des granulocytes neutrophiles ou encore des monocytes, *via* la sécrétion de cytokines. Les fonctions de l'ensemble des cellules appartenant aux SI inné sont résumées dans le tableau 1 (Topham and Hewitt 2009; Geissmann et al. 2010).

Ainsi, au contact du pathogène, les mastocytes vont libérer le contenu de leurs granules comportant entre autres des médiateurs chimiques impliqués dans l'inflammation, comme l'histamine, qui vont permettre la vasodilatation des vaisseaux sanguins et donc faciliter l'arrivée d'autres cellules immunitaires comme les neutrophiles sur le site de l'infection (da Silva, Jamur, and Oliver 2014). Le pathogène va être pris en charge et phagocyté par les macrophages et les DC, et les cellules infectées seront tuées par les cellules NK. Ces cellules immunitaires vont également sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα (Tumor Necrosis Factor α), l'interleukine-1 (IL-1) et l'IL-6 ainsi que des cytokines chimioattractantes comme l'IL8 et CXCL10, afin d'attirer vers le site de l'infection d'autres cellules du SI inné présentes dans la circulation sanguine, telles que les granulocytes neutrophiles, les monocytes, d'autres cellules NK et les DC (Arango Duque and Descoteaux 2014) (Figure 1). Les cellules NK font partie de la famille des cellules innées lymphoïdes (ILC) qui sont des cellules du système immunitaire dépourvues de récepteurs spécifiques aux antigènes, dont les fonctions effectrices sont similaires à celles des cellules T de la réponse adaptative et proviennent des mêmes progéniteurs que les lymphocytes appelés progéniteurs lymphoïdes commun (CLP) (Cherrier 2014; Das et al. 2018).

Les cellules du SI inné ne sont pas capables de reconnaitre spécifiquement un pathogène mais vont reconnaître, *via* leurs récepteurs appelés PRR (Pattern-Recognition Receptors), soit des

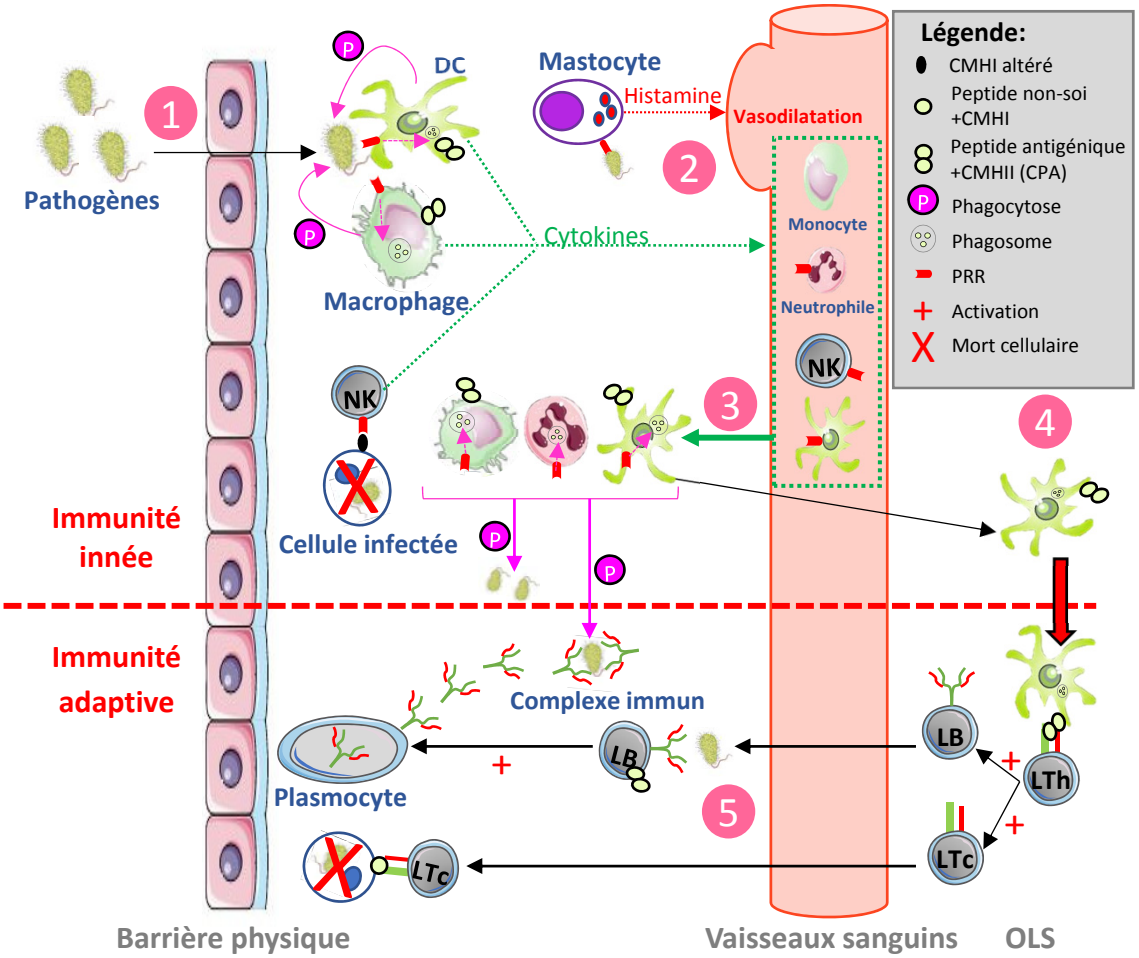


Figure 1: Schéma de l'activation de la réponse immunitaire. *(Modifié d'après http://slideplayer.fr)*
Un pathogène entrant dans l'organisme doit tout d'abord franchir les barrières physiques telles que la peau ou les muqueuses (**1**). Ensuite, il entre en contact avec des cellules « sentinelles » appartenant au SI inné, comme les mastocytes, les cellules NK (cytotoxiques envers les cellules présentant un complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMHI) modifié) ainsi que les cellules dendritiques (DC) et les macrophages. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les cellules NK, DC et macrophages ainsi que la sécrétion d'histamine par les mastocytes (permettant la vasodilatation des vaisseaux sanguins (**2**)) vont permettre de faciliter l'arrivée d'autres cellules immunitaires sur le site de l'infection (**3**). Dans le cas où les pathogènes résistent à l'action des cellules du SI inné, l'activation du SI adaptatif sera nécessaire. Pour cela, les cellules présentatrices d'antigènes (ou CPA qui expriment des peptides antigéniques liés à une molécule CMHII) comme les DC, vont rejoindre la circulation sanguine pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires (OLS) afin de présenter des peptides antigéniques présents à leur surface aux lymphocytes T helper (Th) pour les activer (**4**). Les LTh vont ensuite activer les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T cytotoxiques (LTc), qui vont rejoindre les tissus infectés. Au contact du pathogène, les LB vont se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Ac) (**5**). Ces Ac vont reconnaitre le pathogène et former un complexe immun qui sera ensuite reconnu puis éliminé par les cellules phagocytaires. Les LTc, quant à eux, vont exercer leur pouvoir cytotoxiques spécifiquement sur les cellules infectées présentant des molécules du CMHI liées à un peptide du non-soi à leur surface.

groupes ou ”patterns” de molécules communément retrouvés sur certains pathogènes appelés PAMPS (Pathogen-Associated Molecular Patterns), soit des motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires appelés DAMP (Danger Associated Molecular Pattern) (Suresh and Mosser 2013). Cette interaction va initier l’activation de voies de signalisation, aboutissant à l'expression de cytokines ou de chimiokines qui vont protéger l'hôte d'une infection microbienne (Kawasaki and Kawai 2014).

Malgré l’action précoce du SI inné, certains pathogènes peuvent résister à ce SI ou y échapper. Pour pallier à ce problème, les cellules présentatrices d’antigènes (CPA) comme les DC et les macrophages, vont aller activer les effecteurs du SI adaptatif dont la réponse sera plus spécifique au pathogène. Brièvement, les CPA vont présenter à leur surface des déterminants antigéniques (issus de pathogènes préalablement phagocytés) qui vont être reconnus par des lymphocytes T (cellules de l’immunité acquise) qui seront ainsi stimulés (Trinchieri et al. 1993). Ces derniers vont ensuite activer d’autres lymphocytes, les lymphocytes B. On passe alors d'une réponse immunitaire non spécifique (destruction d'un élément quelconque du non-soi) à une réponse immunitaire spécifique (destruction d’un élément précis du non soi) (Figure 1).

1.1.2.2- Le système immunitaire adaptatif

L’activation de l’immunité adaptative se fait essentiellement au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLS). Les OLS sont composés des ganglions lymphatiques, de la rate et des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses ou MALT (mucosa-associated lymphoid tissue), comprenant les amygdales et les plaques de Peyer (Figure 2) (Jønsson 1985). Les OLS sont des sites privilégiés de rencontre entre les Ag et les cellules immunitaires. C’est au niveau de ces OLS que s’effectuent les premières phases de la réaction immunitaire dite adaptative. L’immunité adaptative ou acquise est un mécanisme de défense qui fait appel à la reconnaissance de la nature de l'Ag permettant le développement d'une réponse adaptée *via* la production de cellules et de molécules spécialisées. Sa mise en place est retardée par rapport à l’immunité innée puisque qu’elle intervient quelques jours après l’infection. L’immunité adaptative fait intervenir les lymphocytes T (LT) et B (LB) qui possèdent à leur surface un récepteur, appelé respectivement TCR (T cell receptor) et BCR (B cell receptor), capable de reconnaitre avec une grande spécificité les Ag pénétrant dans l’organisme.

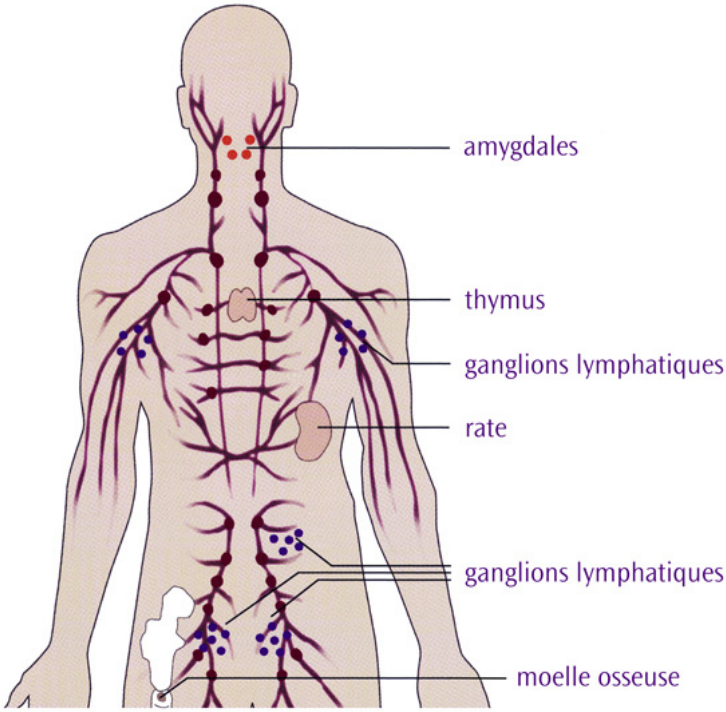


Figure 2: Localisation des organes lymphoïdes primaires et secondaires dans l'organisme.
(Source: www.lymphoma.ca)

Répartition des différents organes lymphoïdes primaires et secondaires dans l'organisme. La moelle osseuse et le thymus sont des organes lymphoïdes primaires, ils sont le lieu de maturation des LB et des LT respectivement. La rate, les ganglions lymphatiques et les amygdales sont des organes lymphoïdes secondaires, ils sont le lieu de rencontre entre les pathogènes et les lymphocytes résidents. Les ganglions sont répartis dans tout l'organisme et joue le rôle de filtre de la lymphe venant des vaisseaux lymphatiques alors que la rate joue le rôle de filtre de la circulation sanguine (Jønsson 1985).

A- Les lymphocytes, acteurs du système immunitaire adaptatif

Les lymphocytes sont des cellules sanguines faisant partie de la famille des leucocytes ou globules blancs. La population sanguine lymphocytaire comprend en moyenne 10-15% de LB, 65-75% de LT et 10-20% de cellules NK (Manda et al. 2003; J. Choi et al. 2014). Les LB et les LT sont semblables d'un point de vue morphologique mais divergent d'un point de vue moléculaire et fonctionnel.

A.1- Les lymphocytes T

Les lymphocytes T expriment à leur surface un récepteur spécifique aux Ags appelé TCR (pour T cell Receptor), ce qui les différencie des cellules de l'immunité inné. De plus, les LT expriment un certain nombre de protéines membranaires telles que des intégrines, des récepteurs de cytokines, ainsi qu'un certain nombre de cluster de différentiation. Il existe deux grands types de LT, les LT auxiliaire ou helper (LTh) et les LT cytotoxiques (LTc), avec des fonctions différentes dans la réponse immunitaire. Les LTc, expriment à leur surface le cluster CD8. Ils sont impliqués dans l'élimination des cellules infectées par un pathogène et des cellules cancéreuses *via* la sécrétion de cytokines comme l'interféron gamma (IFN-γ) et le TNF-α (pour Tumour Necrosis Factor). Ils sont également capables de libérer le contenu de leurs granules (comportant la perforine et les granzymes) dans le but d'induire l'apoptose des cellules dangereuses (Andersen et al. 2006). Les LTh expriment à leur surface le cluster de différenciation CD4. Ils vont avoir pour rôle principal d'orchestrer la réponse immunitaire. Il existe trois types principaux de LTh, les Th1, les Th2 et les Th17, avec des phénotypes distincts de sécrétion de cytokines, induisant des caractéristiques fonctionnelles spécifiques pour chacun des types. Les cellules Th1 sécrètent des cytokines comme l'IFN-γ et le TNF-β, qui leur permettent d'être particulièrement efficaces contre les infections intracellulaires (virales et bactériennes) ou pour l'élimination des cellules cancéreuses *via* l'activation des cellules cytotoxiques LTc et des cellules NK (Kaiko et al. 2008; Annunziato, Romagnani, and Romagnani 2015). Les cellules Th2 sécrètent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13. Ils ciblent les organismes parasitaires, régulent la production d'anticorps et activent les cellules B (Kaiko et al. 2008). Enfin, les cellules Th17, dont la différentiation est sous l'influence du facteur de transcription RORγt (He et al. 2017), sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-

17, l'IL-23 et l'IL-6, qui leur permettent de jouer un rôle dans l'inflammation des tissus et l'activation des neutrophiles pour combattre les bactéries extracellulaires et certains champignons (Kaiko et al. 2008). Ces types de LTh et les cytokines qu'ils libèrent sont antagonistes l'un de l'autre et sont dominants en réponse à un agent pathogène particulier.

Parmi les cellules CD4+, il existe une autre population de cellules T qui diffère des LT auxiliaires, appelée lymphocyte T régulateur (Treg). Les cellules Treg sont en charge de la suppression des activités potentiellement délétères des LTh et permettent de prévenir les maladies auto-immunes en maintenant l'auto-tolérance. Ces Treg sécrètent de l'IL-10, de l'IL-4 et du TGF-β (pour Transforming Growth Factor), qui modulent l'activité des lymphocytes T auxiliaires et suppriment certaines de leurs fonctions, induisant une tolérance aux Ags (Corthay 2009).

Une des caractéristiques du système immunitaire adaptatif est sa capacité à répondre de manière plus rapide et plus efficace contre des pathogènes déjà rencontrés. Cette réponse est appelée réponse mémoire ou secondaire. Après un premier contact antigénique, des lymphocytes T CD8+ et des lymphocytes CD4+ mémoire se forment. Ces cellules ont un taux de renouvellement plus important et plus rapide en présence de d'Ag et également une meilleure spécificité à l'antigène que les cellules T naïves (Boyman et al. 2009). Les lymphocytes T mémoire réactivés sécrètent également des quantités importantes de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui favorisent l'activation et le recrutement des cellules immunitaires (Lauvau and Soudja 2015). Il existe au moins deux grandes sous-populations de cellules T mémoires, d'une part, les cellules T mémoires effectrices (TEM) qui possèdent une activité cytolytique permettant de combattre rapidement les pathogènes à leur site d'entrée (grâce à la sécrétion d'IFN-γ et de perforine) et d'autre part, les cellules T de mémoire centrale (TCM) qui permettent de soutenir plus longtemps la réponse immunitaire en activant la prolifération des TEM et en interagissant avec les CPA dans les OLS (Sallusto et al. 1999). Ces deux populations se distinguent par l'expression du récepteur de chimiokine CCR7 qui est présent sur les TCM mais absent sur les TEM (Sallusto et al. 1999). Ces cellules sont principalement retrouvées dans la rate, le sang et les ganglions lymphatiques mais d'autres types de cellules mémoires comme les cellules T mémoires résidentes du tissu (TRM), sont retrouvées au niveau de la peau, des intestins et des poumons (Mueller et al. 2013).

A.2- Les lymphocytes B

Comme pour les LT, les lymphocytes B (LB) possèdent à leur surface des récepteurs spécifiques aux antigènes aussi appelés immunoglobulines (Ig). Les Ig peuvent être soit membranaires, alors appelées BCR (pour B cell receptor), soit sécrétées, appelées alors anticorps. Les anticorps sont sécrétés par les plasmocytes qui sont issus de la différentiation de cellules B activées après liaison à un Ag. De plus, les LB expriment à leur surface de nombreuses protéines essentielles à leur bon fonctionnement. Parmi elles se trouve la molécule CD20, présente sur l'ensemble des LB matures. Elle joue un rôle dans la maturation et la prolifération des cellules B (LeBien and Tedder 2008). Cette molécule est d'ailleurs la cible du rituximab, un immunosuppresseur utilisé pour traiter des lymphomes de type non hodgkinien (M. R. Smith 2003). D'autres molécules de surfaces ont été observées telles que CD19, CD21 et CD22 impliquées dans la régulation de la réponse des LB après contact avec un Ag donné (Poe, Hasegawa, and Tedder 2001).

Il existe deux grands types de LB matures, les lymphocytes B-1 et les lymphocytes B-2 (Rothenberg 2016). Les lymphocytes B-2, dits LB conventionnels, sont des LB qui se situent principalement dans la rate et les ganglions lymphatiques. Ils se subdivisent en deux types de LB B-2, les LB folliculaires (LB Fo) et les LB de la zone marginale (LB ZM), qui portent le nom de la zone qu'ils occupent au sein des organes lymphoïdes secondaires. Les LB Fo se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Ac) de haute affinité qui vont essentiellement reconnaitre des Ag dits thymo-dépendants, c'est-à-dire que la réponse immunitaire induite par ces antigènes nécessite l'aide des LTh (Y. Zhang, Garcia-Ibanez, and Toellner 2016). En revanche, les LB ZM se différencient rapidement en plasmocytes sécréteurs d'Ac de basse affinité (principalement d'isotype IgM) et reconnaissent des Ag thymo-indépendants (et également thymo-dépendants) capables de stimuler directement les LB sans l'intervention des LTh (Pillai, Cariappa, and Moran 2005). Les lymphocytes B de la ZM constituent ainsi la première ligne de défense de l'organisme contre des pathogènes provenant du flux sanguin avant même que la réponse adaptative soit assurée par les lymphocytes B FO (Oliver, Martin, and Kearney 1999). Quant aux cellules B-1, elles ont essentiellement été décrite chez la souris et comprennent les cellules B-1a (CD5+) et B-1b (CD5-) (Martin, Oliver, and Kearney 2001; Hardy 2006). Elles répondent également à des Ag thymo-indépendants et ont la capacité de sécréter spontanément des anticorps naturels IgM de faible affinité (Martin, Oliver, and

Kearney 2001). Elles se localisent principalement dans les cavités péritonéale et pleurale et jouent un rôle crucial dans les étapes précoces des réponses antivirales et antibactériennes. Chez l'homme, l'existence des cellules B1 reste controversée, mais il a été proposé que les cellules CD20+CD27+CD43+CD70- du sang de cordon ou du sang périphérique adulte correspondraient aux cellules B1 murines (Griffin, Holodick, and Rothstein 2011).

De la même manière que pour les LT, après une première rencontre avec un Ag, une partie des LB activés va se différencier en LB mémoire. Lors d'un premier contact avec un Ag, les LB vont former une structure au sein des OLS, appelée centre germinatif dont le but est d'augmenter la spécificité des BCR (ou immunoglobuline) vis-à-vis de l'Ag. Deux mécanismes ont lieu dans le centre germinatif. D'une part, un mécanisme permettant d'induire des mutations aléatoires au sein des domaines variables des immunoglobulines appelé hypermutation somatique et, d'autre part, un processus qui permet de changer la partie constante des immunoglobulines et ainsi de modifier l'isotype, appelé commutation de classe (McHeyzer-Williams et al. 2012). Seuls les LB ayant une haute affinité pour l'Ag en question survivront pour devenir des lymphocytes B mémoire. En cas d'une seconde infection par le même Ag, une partie des lymphocytes B mémoire se différenciera en plasmocytes sécréteurs d'Ac à haute affinité, l'autre partie constituera un pool de LB mémoire, capable de se diviser et de se différencier rapidement en cas d'une nouvelle infection. En plus d'être hautement spécifique à un Ag donné, les LB mémoire sont également persistants dans le temps. En effet, il a été trouvé, chez l'homme, des lymphocytes B mémoire spécifiques au virus de la variole près de 50 ans après une vaccination anti-variolique (Hammarlund et al. 2003; Crotty et al. 2003).

B- Reconnaissance antigénique et réponse immunitaire

L'interaction avec l'Ag peut s'effectuer de deux manières différentes, soit par reconnaissance directe par les LB *via* leur BCR, soit *via* les cellules présentatrices d'Ag (CPA) qui vont phagocyter l'Ag et vont ensuite exposer à leur surface des peptides antigéniques qui seront présentés aux lymphocytes T (Berzofsky et al. 1988). Il existe deux types de CPA. D'une part, les CPA « non professionnelles » qui englobent l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme (excepté les cellules germinales) et qui vont présenter aux LT, des peptides antigéniques endogènes *via* les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I).

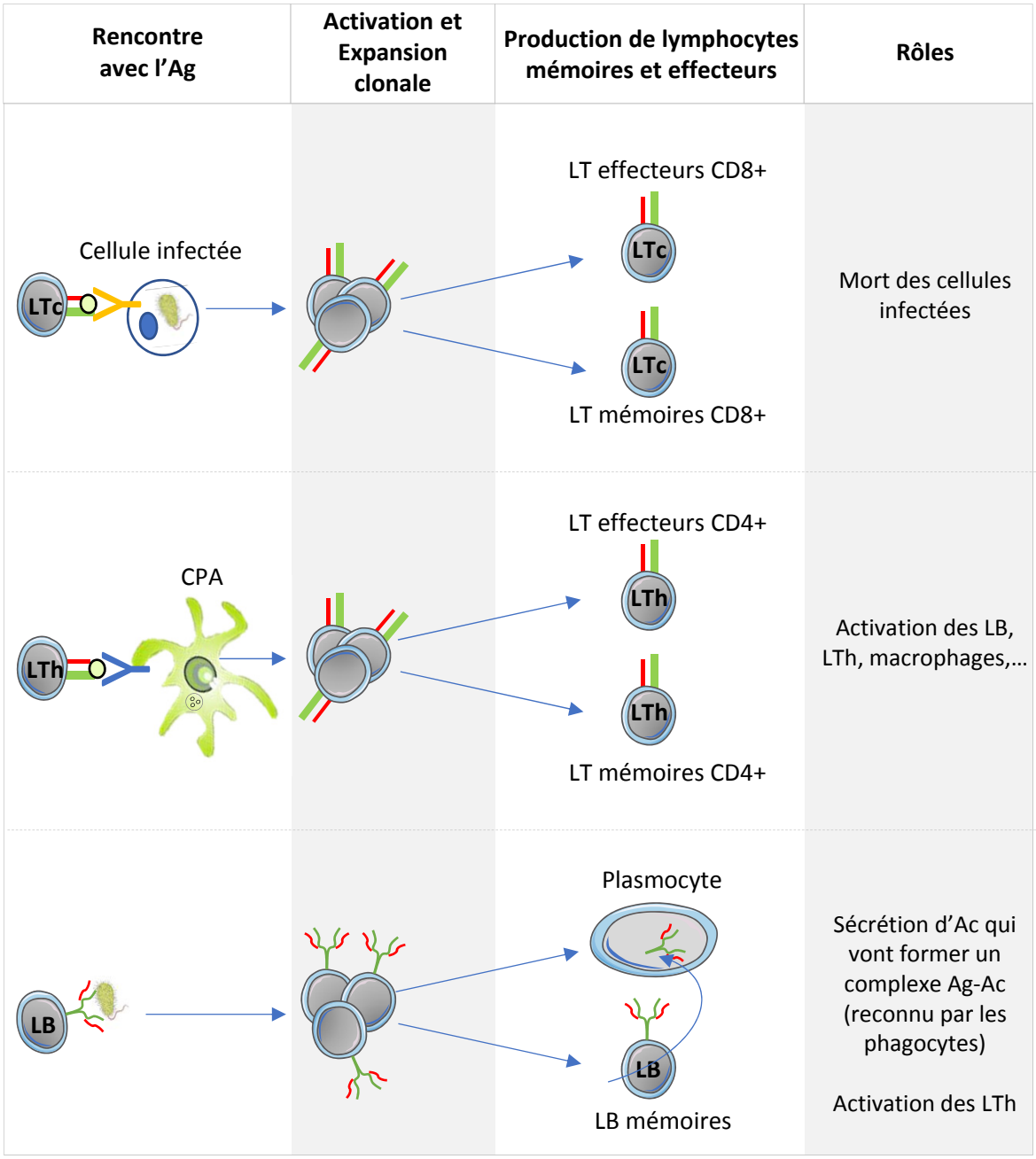


Figure 3: Activation des LB et LT

La rencontre des différents lymphocytes avec un pathogène donné s'effectue de différentes manières. Les LTc sont activés par les fragments antigéniques présentés par les molécules du CMH I présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme alors que les LTh sont activés par les fragments antigéniques présentés par les molécules du CMH II présentent sur les CPA. Les lymphocytes B sont activées après liaison du BCR avec l'antigène. De manière intéressante, les LB expriment les molécules du CMH de classe I et II, ce qui en fait des cellules présentatrices d'Ag capables d'activer les LTh.

L'activation des lymphocytes entraine leur prolifération. Une partie des LT et des LB produits vont se différencier en cellules mémoire qui seront capables de répondre plus efficacement à ce même antigène si une seconde infection devait avoir lieu.

D'autre part, les CPA « professionnelles », qui comportent les macrophages, les cellules dendritiques et les LB. Ces dernières vont présenter des peptides antigéniques exogènes aux LTh *via* les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) (Neefjes et al. 2011). La reconnaissance d'un déterminant antigénique par les récepteurs membranaires lymphocytaires va engendrer l'activation, la prolifération et la maturation des LB et des LT qui vont venir en aide aux cellules du SI innée (Figure 1). Une fois l'Ag neutralisé, se met en place un répertoire de lymphocytes mémoire, correspondant à des lymphocytes T et B ayant une forte affinité pour l'Ag ce qui permettra ainsi d'engendrer une réponse plus rapide et plus efficace en cas d'une nouvelle infection par ce même Ag (Sallusto et al. 1999; Dogan et al. 2009) (Figure 3).

1.2- Le système immunitaire adaptatif : récepteurs spécifiques de l'antigène

La particularité de l'immunité adaptative réside dans le fait que la reconnaissance des antigènes présents dans l'organisme est spécifique à ces derniers. Cette spécificité de reconnaissance est permise par la présence de récepteurs membranaires à la surface des LT et des LB.

1.2.1- Les récepteurs à l'antigène des lymphocytes

Pour les deux grands types lymphocytaires, les récepteurs ont pour particularité de posséder une région variable et une région constante. La région variable va présenter une séquence différente d'un lymphocyte à l'autre et ainsi permettre de reconnaitre un large répertoire d'Ag. Malgré ces similitudes, les récepteurs des LB et des LT présentent des structures différentes et des partenaires différents.

1.2.1.1- Le récepteur à l'antigène des lymphocytes T

Le récepteur aux Ags des LT ou TCR (T cell receptor) fournit aux cellules T la capacité de reconnaitre spécifiquement les peptides antigéniques présentés par les CPA et liés aux molécules du CMH qu'il a appris à reconnaitre durant sa maturation dans le thymus. Chaque LT exprime un seul type de TCR qui ne peut reconnaitre qu'un type d'antigène. Les TCR sont

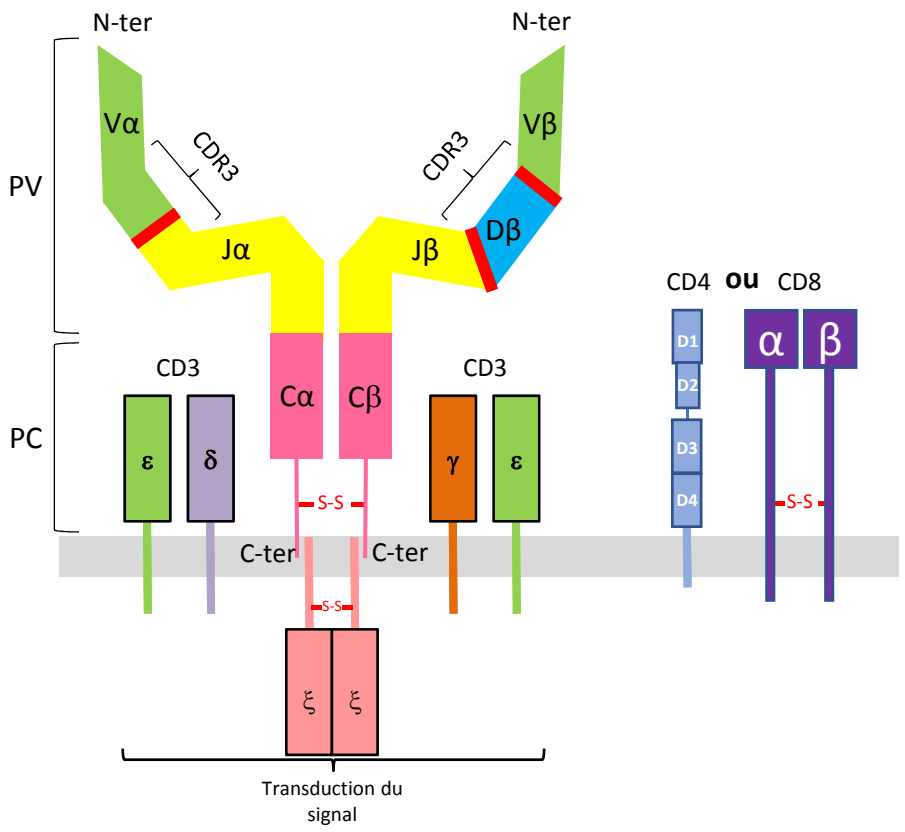
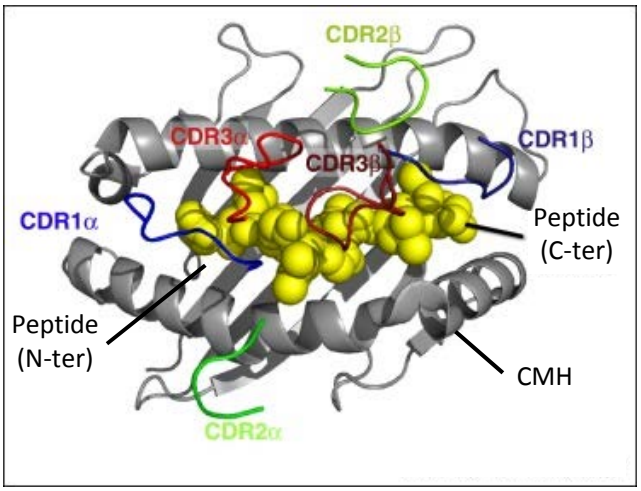


Figure 4: Structure du récepteur aux antigènes des lymphocytes T (ou TCR) de type αβ.

Le TCR αβ est constitué de l'association, *via* un pont disulfure, d'une chaîne lourde β avec une chaîne légère α. Chaque chaîne est composée d'une partie constante (PC) et d'une partie variable (PV) qui permet la reconnaissance du peptide antigénique présenté par les molécules du CMH. La partie variable de la chaîne α est constituée à partir de 2 types de segments géniques : un segment V (pour variable) et un segment J (pour jonction). La partie variable de la chaîne β est formée à partir de 3 types de segments: un segment V, un segment J et un segment D (pour diversité). Le TCR est associé à un complexe CD3 formé de six chaînes: une chaîne CD3γ, une chaîne CD3δ, deux chaînes CD3ζ et deux chaînes CD3ε. CD3 permet la transduction du signal responsable de l'activation cellulaire après reconnaissance antigénique. Les marqueurs CD4 et CD8 sont respectivement exprimés sur les LTh (CD4+) et les LTc (CD8+). Ces marqueurs participent à la reconnaissance du peptide antigénique par le TCR *via* leur liaison aux molécules du CMH de classe I (pour CD8) et II (pour CD4) qui vont présenter ce peptide. La région CDR3 est une région hypervariable qui va permettre la reconnaissance spécifique du peptide antigénique présenté par les CPA (Wucherpfennig, 2010).

des glycoprotéines transmembranaires de type I de 80-90 kDa faisant partie de la superfamille des immunoglobulines. Il s'agit d'un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques différentes, une chaîne légère (α ou γ) et une chaîne lourde (β ou δ) liées de façon covalente par un pont disulfure intracaténaire. Il existe deux types de TCR, le TCR αβ, qui représente 95% des TCR présents à la surface des LT, est majoritairement retrouvé dans les organes lymphoïdes secondaires (Morahan, Malcolm, and Miller 1987; Hunter, Teijeira, and Halin 2016) et le TCR γδ, qui représente 5% des LT, plutôt associé à la muqueuse intestinale et au tractus respiratoire (Vroom et al. 1991). Les TCR γδ ne faisant pas l'objet de notre étude, nous ne présenterons que les TCR αβ (Figure 4). Les chaînes du TCR sont constituées d'un domaine hydrophobe transmembranaire, permettant leur ancrage dans la membrane cytoplasmique et de deux domaines extracellulaires, un domaine constant (à l'extrémité C terminal) et un domaine variable (à l'extrémité N terminal). La partie variable de chacune des chaînes contient trois régions hypervariables, aussi appelées régions déterminant la complémentarité ou CDR (pour « Complementary Determining Region »), s'associant pour former le paratope qui interagira avec le complexe CMH-peptide. Les régions CDR1 et CDR2 vont interagir avec les molécules du CMH ainsi que la partie C-terminale du peptide antigénique pour CDR1β et la partie N-terminale pour CDR1α (Wucherpfennig et al. 2010; Stone, Harris, and Kranz 2015) (Figure 5). La région CDR3 est une région hypervariable qui va permettre la reconnaissance spécifique du peptide antigénique (Wucherpfennig et al. 2010).

Bien que le TCR joue un rôle central dans la reconnaissance antigénique, l'intervention de corécepteurs est nécessaire pour déclencher une réponse immunitaire complète. Ainsi, les TCR αβ sont associés à un co-récepteur CD4 ou CD8 et au complexe CD3. Les co-récepteurs CD4 et CD8 sont impliqués dans l'interaction des LTh et des LTc, respectivement, avec les molécules du CMH. La glycoprotéine CD4 est composée de quatre domaines extracellulaire (D1 à D4) et d'un court domaine intracellulaire alors que CD8 est composé d'une chaîne alpha et d'une chaîne beta (Figure 4). Les co-récepteurs CD8 et CD4 interagissent respectivement avec le CMH de classe I et II des CPA (Gao, Rao, and Bell 2002). Quant au complexe CD3, il n'intervient en rien dans la reconnaissance du peptide antigénique mais permet la transduction du signal après contact avec les CPA (Love and Hayes 2010). Le complexe CD3 est formé de six chaînes : une chaîne CD3γ, une chaîne CD3δ, deux chaînes CD3ζ et deux chaînes CD3ε. La chaîne γ, la chaîne δ et les deux chaînes ε possèdent chacune un domaine immunoglobuline-like et une région intra-cytoplasmique longue présentant des motifs ITAM



Modifiée d'après Stone et al, 2015

Figure 5: Représentation 3D de l'interaction entre le TCR et un peptide antigénique présenté par une molécule du CMH

La partie variable de chacune des chaînes du TCR renferme trois régions hypervariables ou CDR (pour « Complementary Determining Region »). Les régions CDR1 (en bleu) et CDR2 (en vert) vont interagir avec les molécules du CMH (en gris). CDR1 de la chaîne β interagit également avec la partie C-terminale du peptide antigénique, alors que CDR1 de la chaîne α interagit avec la partie N-terminale. Les régions CDR3 (en rouge) sont indispensables à la reconnaissance spécifique du peptide antigénique puisqu'elles interagissent exclusivement avec ce dernier.

(Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) (Letourneur and Klausner 1992). Ces Motifs ITAM sont des motifs d'activation présentant des tyrosines pouvant être phosphorylées par des kinases lors de la transmission du signal afin d'activer le LT (Love and Hayes 2010). Les chaînes ε s'associent en hétéro-dimères avec les chaînes γ et δ. Les deux chaînes ζ ont une très grande partie intra-cytoplasmique, possèdent chacune deux motifs ITAM et forment entre elles un homodimère (Figure 6).

1.2.1.2- Le récepteur à l'antigène des lymphocytes B

Les Ig sont des protéines pouvant exister sous forme membranaire (BCR pour B cell receptor) ou sous forme soluble (anticorps). Le BCR présent à la surface des LB va directement reconnaître un Ag de l'environnement. Tout comme les LT, chaque LB n'exprime qu'un seul type de BCR en plusieurs exemplaires. Il est à noter qu'il existe 5 isotypes d'Ig (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM).

Les Ig sont des hétéro-tétramères constitués de deux chaînes légères L (pour Light) identiques et deux chaînes lourdes H (pour Heavy) identiques, ces dernières étant différentes selon l'isotype (Figure 7). Il existe deux types de chaînes légères, la chaîne Kappa et la chaîne Lambda et 5 types de chaînes lourdes (epsilon pour les IgE, mu pour les IgM, delta pour les IgD, alpha pour les IgA et gamma pour les IgG). Il est à noter que les IgA et les IgG sont subdivisés en sous-classes IgA1 et IgA2 et IgG1 à IgG4.

Chaque chaîne est constituée d'un domaine variable à l'extrémité N-terminale (VH ou VL) qui comprend le site de liaison à l'antigène, d'un domaine constant pour les chaînes légères (CL) et de trois ou quatre domaines constants (CH1 à CH4) pour les chaînes lourdes à l'extrémité C-terminale (3 CH pour IgG, IgD et IgA et 4 CH pour IgM et IgE). Des ponts disulfures permettent de lier les chaînes légères aux chaînes lourdes ainsi que les chaînes lourdes entre elles. Les sites de liaison à l'antigène sont constitués par l'association des 3 régions hypervariables du VH aux 3 régions hypervariables du VL, également appelés CDR, séparées par des régions dites « framework » qui permettent un maintien de la structure. La structure de base des Ig possède deux sites de reconnaissance de l'épitope ce qui lui confère la capacité de lier deux antigènes identiques. Les anticorps peuvent être divisés en plusieurs fragments, le fragment Fc et les fragments Fab. Le fragment Fc (pour fragment cristallisable) correspond aux domaines CH2 et CH3 ou aux domaines CH2 à CH4 des deux chaînes lourdes qui

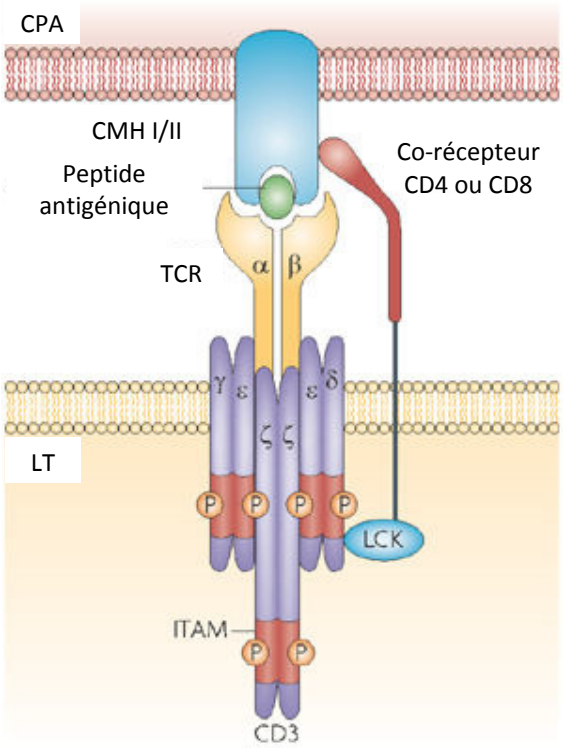


Figure modifiée d'après Gascoigne, 2008

Figure 6: Schéma de l'interaction entre une CPA et un LT

Après avoir phagocyté le pathogène, les CPA vont exposer à leur surface des peptides antigéniques qui seront présentés, *via* le CMH, aux lymphocytes T. Selon le type de CPA, les peptides antigéniques peuvent être présentés soit par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) activant les LTc, soit par les molécules du CMH II activant les LTh. L'intervention d'un corécepteur CD4 ou CD8 ainsi que du complexe CD3 sont nécessaires pour déclencher une réponse immunitaire complète. Les co-récepteurs CD4 et CD8 sont impliqués dans l'interaction des LTh et des LTc, respectivement, avec les molécules du CMH. Quant au complexe CD3, il permet la transduction du signal après contact avec les CPA. Les chaînes composant le complexe CD3 possèdent une région intra-cytoplasmique longue présentant des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Ces motifs ITAM présentent des tyrosines pouvant être phosphorylées par des kinases comme Lck (pour *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) aboutissant à une transmission de signal activant le LT.

interagissent avec les cellules et les molécules effectrices. Les fragments Fab (pour fragment antigen binding) correspondent aux deux bras de la molécule d'Ig et comprennent la chaîne légère complète associée aux domaines VH et CH1 de la chaîne lourde (Figure 7). Tout comme le TCR, le BCR ne peut à lui seul transmettre le signal. Ainsi, il est toujours associé au dimère Igα-Igβ (ou CD79 a et b). Ces deux chaînes sont constituées d'une partie extracellulaire avec deux domaines immunoglobuline-like reliés par un pont disulfure, d'une partie transmembranaire et d'une partie intra-cytoplasmique qui permettra la transmission du signal en cas d'activation du BCR, grâce aux motifs ITAM. La reconnaissance de l'Ag par le BCR va aboutir à la phosphorylation de tyrosines situées au niveau des motifs ITAM (L. D. Wang and Clark 2003). Tout comme pour le CD3 du TCR, le dimère Igα-Igβ intervient uniquement dans la signalisation intra-cellulaire et l'assemblage du récepteur (Dylke et al. 2007) (Figure 7).

1.2.2- La recombinaison V(D)J : processus de création du répertoire des récepteurs à l'antigène

Comme nous l'avons vu, les TCR et les BCR présentent des régions variables qui ont pour fonction de reconnaitre les Ag. L'existence d'un grand nombre d'Ag différents dans l'environnement (ou répertoire antigénique) a conduit l'organisme à développer des TCR et des BCR très différents au niveau de leur région variable. On parle de répertoire de TCR ou répertoire de BCR.

1.2.2.1- Aspects génétiques

Dans le but de reconnaître spécifiquement un grand nombre d'Ag différents, l'organisme a mis en place différents processus pour créer de la diversité au sein du répertoire des récepteurs à l'Ag. Parmi ces processus, on trouve la recombinaison V(D)J qui correspond à un mécanisme de réarrangements somatiques au sein des segments géniques codant pour les chaînes qui constituent les récepteurs à l'Ag. Ce mécanisme est commun à la formation des TCR et des BCR. Les segments géniques codant les chaînes des TCR et des Ig constituent des locus différents sur des chromosomes différents d'une espèce à l'autre (Tableau 2). Les différents locus codant les chaînes des TCR et des Ig comportent à l'état non réarrangé plusieurs segments géniques V (pour variable), D (pour diversité ; retrouvé uniquement sur

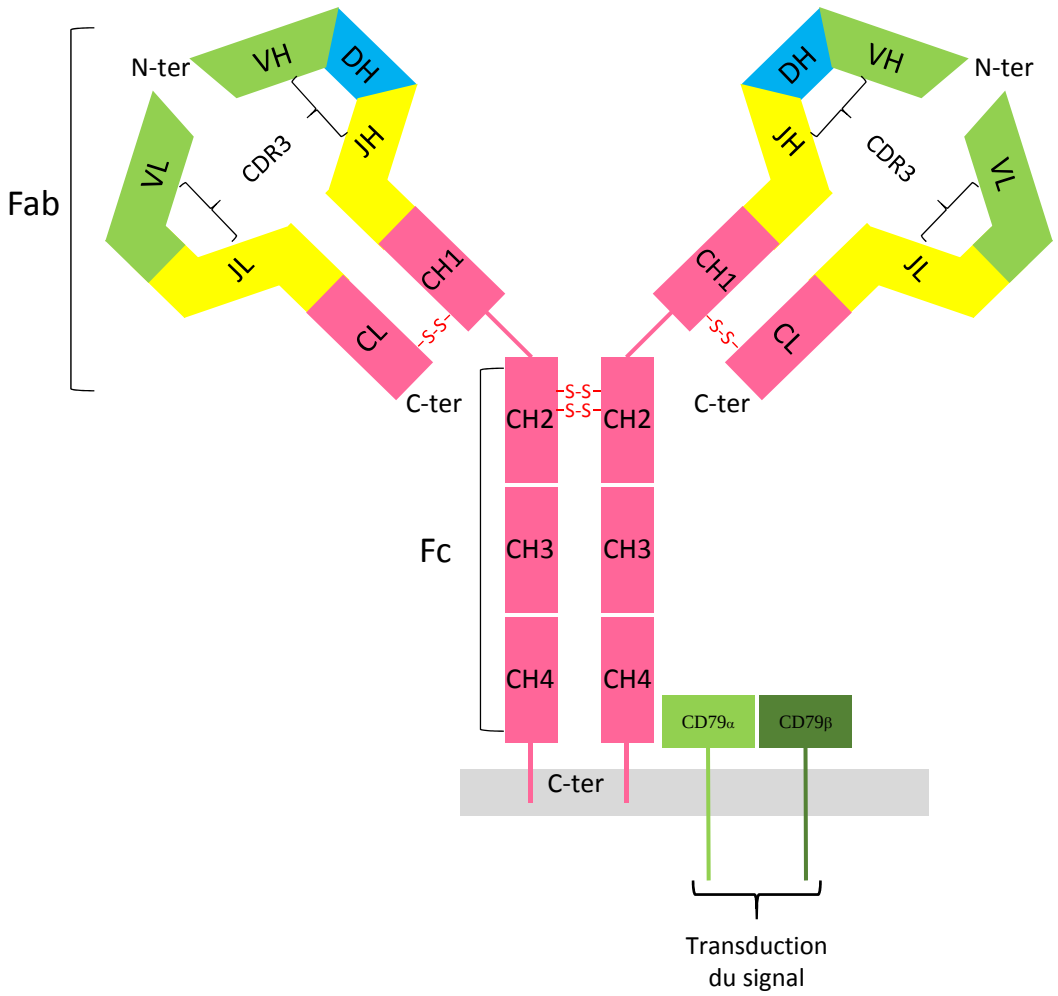


Figure 7: Structure d'un récepteur aux antigènes des lymphocytes B (ou BCR) de type IgM membranaire

Le BCR est constitué de l'association, *via* des ponts disulfures, d'une chaîne lourde H (pour heavy) et d'une chaîne légère L (pour light). Chaque chaîne est composée de 1 à 4 parties constantes C et d'une partie variable V qui permet la reconnaissance des antigènes. La partie variable de la chaîne légère est fabriquée à partir d'un segment V et d'un segment J. La partie variable de la chaîne lourde résulte de l'association de trois segments géniques: V, D et J. Le BCR est associé au complexe CD79a/CD79b permettant la transduction du signal responsable de l'activation cellulaire après reconnaissance antigénique.

les locus codant les chaînes lourdes du TCR et des Ig), J (pour jonction) et C (pour constant) (Figure 8). Le nombre de segments V, (D), J et C chez l'Homme et la souris est indiqué dans le tableau 3 (Giudicelli 2004). Les parties variables des chaînes formant les récepteurs à l'Ag sont constituées à partir d'un segment V, d'un segment D (uniquement pour les chaînes lourdes) et d'un segment J, tandis que la partie constante est constituée d'un segment C. Les segments géniques V, D et J sont classés en famille, d'après leur homologie de séquence (Tableau 4). Une famille peut contenir des segments géniques fonctionnels et non fonctionnels. Le nombre de segments fonctionnels dans une famille est extrêmement variable. Par exemple chez l'Homme, la famille IGHV6 contient un seul segment fonctionnel alors que la famille IGHV3, représente à elle seule la moitié du répertoire des segments géniques V des Ig.

La recombinaison V(D)J consiste à associer de manière plus ou moins aléatoire un segment V, un segment D (uniquement pour les chaînes lourdes) et un segment J (Craig H. Bassing, Swat, and Alt 2002) (Figure 9A). Cette association de segments va conduire à la formation de la région hypervariable CDR3, impliquée dans la reconnaissance spécifique de l'Ag. Cette région CDR3 est constituée de la partie 3' du segment V, du segment D (pour le chaîne lourde) et de la partie 5' du segment J (Figure 9B). On estime que le processus de recombinaison V(D)J et les processus générant la diversité aux sites de jonctions sont capables de produire 10^{11} - 10^{15} Ig différentes (Schroeder 2006) et environ 10^{15} TCRαβ différents (Davis and Bjorkman 1988). Il est à noter que pour les Ig il existe un autre processus qui permet d'augmenter la diversité du répertoire d'Ig, appelé hypermutation somatique. Comme dit précédemment, l'hypermutation somatique est un processus par lequel des mutations ponctuelles sont introduites dans les régions variables des chaînes lourdes et légères du BCR après rencontre avec un Ag (Z. Li 2004). Ce processus intervient chez des LB matures et ne fera pas l'objet de notre étude.

1.2.2.2- Choix des segments V, D et J

La première étape qui permet de créer de la diversité au sein des répertoires TCR et BCR résulte de la recombinaison V(D)J qui permet théoriquement d'associer de façon aléatoire les différents segments géniques. En réalité, cette association n'est pas aléatoire. De nombreuses études ont montré l'existence de biais dans le choix des différents segments. Si les associations V-(D)-J étaient aléatoires, la fréquence d'apparition de l'ensemble des

	Chromosome	
	Homme	Souris
TCRA	14	14
TCRB	6	7
IGH	14	12
IGK	2	6
IGL	22	16

Tableau 2: **Localisation chromosomique des segments géniques codant les chaînes lourdes et légères qui constituent les récepteurs à l'antigène des LT et des LB.**

La localisation chromosomique des gènes codant les chaînes du TCR et du BCR varie en fonction des espèces.

TCRA : chaîne alpha du TCR ; **TCRB** : chaîne beta du TCR **; IGH** : chaîne lourde du BCR ; **IGK** : chaîne légère kappa du BCR ; **IGL** : chaîne légère lambda du TCR

D'après Giudicelli et al 2005 et http://www.imgt.org/.

associations possibles seraient équivalentes. Or, le séquençage de l'ensemble des ADNc de TCRβ murins, issu de thymocytes CD4+CD8+ triés, a permis de mettre en évidence des variations très importantes dans la fréquence des différentes combinaisons possible de Vβ/Jβ et Dβ/Jβ (H. Li et al. 2012). En effet, Li et ses collaborateurs ont constaté que les fréquences des différentes associations Vβ-Jβ et Dβ-Jβ fonctionnelles, étaient très disparates, suggérant ainsi que les associations de segments géniques ne seraient pas aléatoires. Il a par ailleurs été montré que le réarrangement des Vβ dépendait de l'association au préalable de Dβ avec Jβ après sélection thymique (Carpenter et al. 2009).

De manière intéressante, des résultats similaires ont été observés pour les Ig. En effet, les travaux de Raaphorst et ses collaborateurs ont montré que 60% des Ig retrouvées sur les cellules B matures chez l'Homme portaient des segments DH appartenant à la famille DXP (qui appartient à la famille D3) et 14% à la famille DLR (qui appartient à la famille D2) (Raaphorst et al. 1997). Ils ont également constaté que les segments JH4 étaient présents sur 57% des LB alors que les segments JH5 et JH6 étaient présents à 12%. D'autres études ont montré que les répertoires TCR et BCR variaient également avec l'âge et le sexe des individus (Murray et al. 2012; Rechavi et al. 2015). L'ensemble de ces travaux montrent que l'utilisation des segments géniques n'est pas aléatoire. Ces caractéristiques similaires au sein des répertoires TCR et BCR semblent avoir un intérêt biologique important puisqu'il a été démontré que pour un Ag donné, les récepteurs présentent dans leur site de liaison à l'Ag des groupes de séquences similaires appelées «core sequences» qui sembleraient intervenir dans la reconnaissance spécifique des différents agents pathogènes (Trück et al. 2015; Dash et al. 2017).

Les mécanismes à l'origine des biais au sein du répertoire des récepteurs à l'Ag sont à l'heure actuelle peu connus. Des études ont montré que certaines associations V(D)J étaient plus favorablement sélectionnées lors des sélections subies par les lymphocytes durant leur développement (Raaphorst et al. 1997; Carpenter et al. 2009). D'autres travaux ont démontré que le remodelage chromatinien influençait le choix des segments géniques durant la recombinaison V(D)J (C.-R. Xu et al. 2008; Ndifon et al. 2012). Ces différents points seront développés dans les parties 1.2.2.4 et 1.2.3.

1.2.2.3- Mécanismes moléculaires de la recombinaison V(D)J

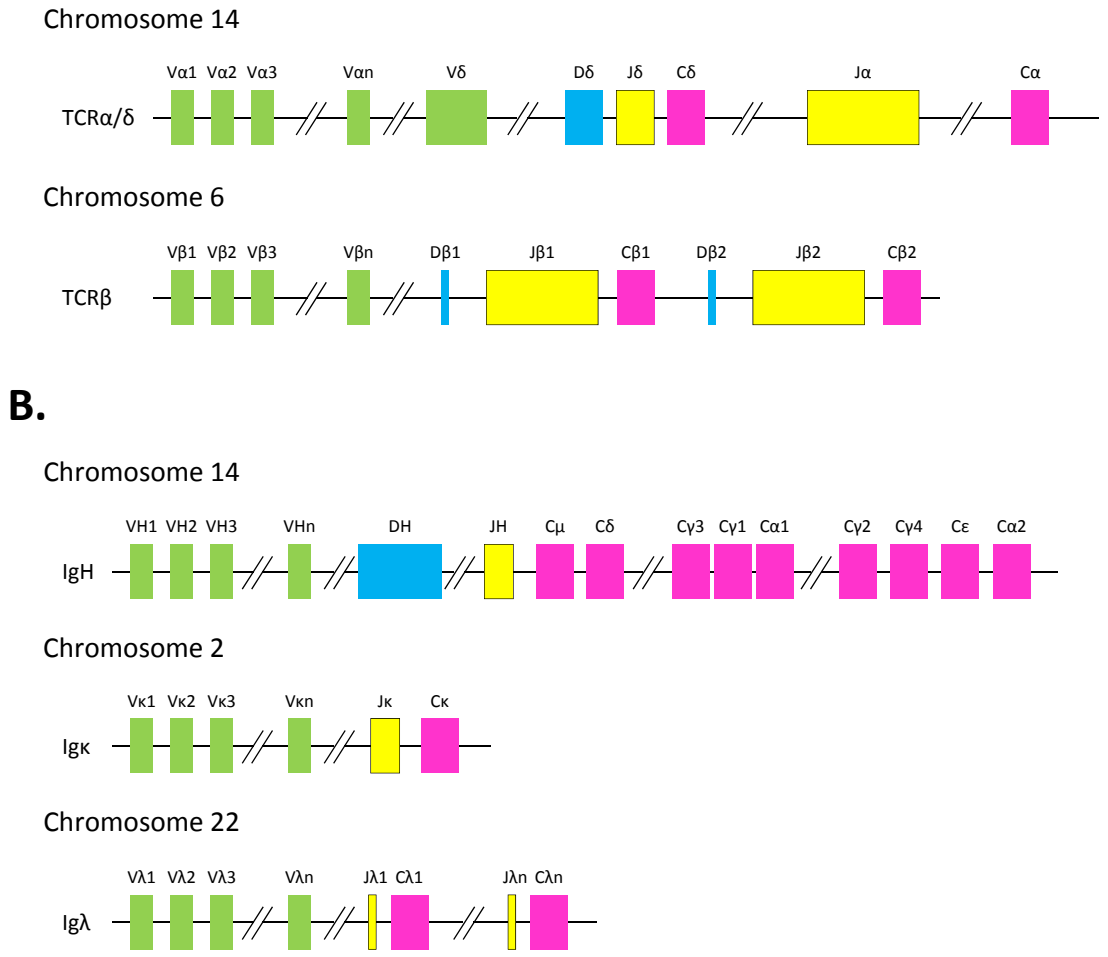


Figure 8: Représentation schématique des locus codant les chaînes du TCR et du BCR chez l'Homme

(figure modifiée d'après https://basicmedicalkey.com)

A. Représentation de l'organisation des différents segments géniques des locus TCRα/δ et TCRβ.

B. Représentation de l'organisation des différents segments géniques des locus IgH, Igκ et Igλ. Le locus IgH comporte 9 gènes constants représentant les différents isotypes d'Ig qui existent dans l'organisme.

Les différents locus codant les chaînes du TCR et des Ig comportent à l'état non réarrangé plusieurs segments V (pour variable), D (pour diversité ; retrouvé uniquement dans les locus codant les chaînes lourdes du TCR et des Ig), J (pour jonction) et C (pour constant).

La recombinaison V(D)J peut être divisée en 4 grandes étapes qui sont résumées dans la figure 10. Ainsi, l'initiation de la recombinaison est réalisée par le rapprochement de deux segments géniques suivi du clivage de l'ADN, d'ajouts éventuels de nucléotides puis de la réparation de l'ADN. Ces différentes étapes de recombinaison vont conduire à la construction d'un locus dont la transcription conduira à l'expression d'une chaîne BCR ou TCR susceptible d'être fonctionnelle.

A- Initiation de la recombinaison V(D)J

Le réarrangement génique des chaînes lourdes des récepteurs à l'Ag débute avant celui des chaînes légères (Craig H. Bassing, Swat, and Alt 2002). La recombinaison V(D)J va être dirigée par des séquences signales de recombinaison (RSS) qui sont situées à l'extrémité 3' des segments V, de part et d'autre des segments D et à l'extrémité 5' des segments J (Figure 10 étape 1). Ces RSS sont constituées d'un heptamère (de séquence consensus CACAGTG) et d'un nonamère (de séquence consensus ACAAAAACC) séparés par un espaceur de 23 ou 12 nucléotides (nommées RSS-23 et RSS-12 respectivement). Au sein du locus IgH, les segments VH et JH possèdent chacun un RSS-23 alors que les segments D possèdent un RSS-12 au niveau de leur extrémité 5' et 3'. Au sein du locus TCRβ, les segments Vβ sont associés à un RSS-23, les segments Jβ à un RSS-12 et les segments D à un RSS-23 à l'extrémité 3' et un RSS-12 à l'extrémité 5' (Craig H. Bassing, Swat, and Alt 2002). La recombinaison débute par la reconnaissance des séquences RSS par des nucléases appelées RAG1 et RAG2 (pour Recombination activating gene) qui vont tout d'abord rapprocher les segments cibles. Les protéines RAG forment un complexe stabilisé par les protéines HMGB1/2 (High Mobility Group Protein) qui permettent une meilleure fixation des protéines RAG sur les RSS. La fixation du complexe RAG sur une RSS va aboutir à l'hybridation d'un RSS ayant un espaceur de 23 nucléotides avec un RSS ayant un espaceur de 12 nucléotides, c'est la règle du 12/23 (Tonegawa 1983). De cette manière, deux segments possédant le même espaceur ne peuvent recombiner entre eux et la recombinaison V(D)J ne peut s'effectuer entre deux segments de même type (H. Lu et al. 2008). Les protéines RAG sont indispensables à l'initiation de la recombinaison V(D)J ainsi qu'à la maturation des lymphocytes. Des études ont montré que leur mutation entraine un blocage de la différenciation des lymphocytes provoquant ainsi un déficit immunitaire combiné sévère (DICS) (Mombaerts et al. 1992; Shinkai et al. 1992). RAG1

A.

	TCRB							
	TRBV		TRBD		TRBJ		TRBC	
	Total	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**
Homme	64-67	40-48	2	2	14	12-13	2	2
Souris	35	21-22	2	2	14	11	2	2

	TCRA					
	TRAV		TRAJ		TRAC	
	Total	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**
Homme	54	45-47	61	50	1	1
Souris	98	73-84	60	38	1	1

B.

	IGH							
	IGHV		IGHD		IGHJ		IGHC	
	Total	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**
Homme	123-129	38-46	27	23	9	6	11	9
Souris	152	97	17-20	14	4	4	8-9	8-9

	IGL					
	IGLV		IGLJ		IGLC	
	Total	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**
Homme	73-74	29-33	7-11	4-5	7-11	4-5
Souris	8	8	5	3	4	2-3

	IGK					
	IGKV		IGKJ		IGKC	
	Total	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**	**Total**	**Fonctionnel**
Homme	76	34-38	5	5	1	1
Souris	174	94-96	5	4	1	1

Tableau 3: Nombre de segments géniques dans les locus codant les chaînes lourdes et légères du TCRαβ et du BCR.

A. Comparaison du nombre de segments V (variable), D (diversité), J (jonction) et C (constant) dans les locus codant les chaînes légères α et lourdes β du TCR chez l'Homme et la souris.

B. Comparaison du nombre de segments V, D, J et C dans les locus codant les chaînes légères et lourdes du BCR chez l'Homme et la souris.

D'après Giudicelli et al 2005 et http://www.imgt.org/.

se lie aux RSS hybridés *via* son domaine de liaison au nonamère et son domaine central de liaison à l'heptamère. Ensuite, RAG2 se lie à RAG1 pour former un complexe qui va être capable de réaliser une coupure en simple brin de l'ADN entre la séquence codante des segments à réarranger et les RSS. L'activité catalytique de clivage est portée par RAG1, RAG2 joue un rôle important dans la stabilisation du complexe et la reconnaissance des sites de clivages (Roth 2014). Le clivage de l'ADN engendre la formation d'une extrémité 3'OH libre qui va attaquer le brin d'ADN opposé par une réaction de transestérification formant des structures en épingle à cheveux aux extrémités des segments géniques et des bouts francs aux extrémités des séquences non codantes flanquées par les RSS.

B- Recrutement du système de réparation NHEJ

La cassure double brin de l'ADN causée par les protéines RAGs, va engendrer le recrutement du système de réparation de l'ADN NHEJ (pour Non Homologous End Joining) (Brandsma and Gent 2012) (Figure 11). Les protéines Ku70 et Ku80 vont se fixer au niveau des extrémités de la cassure de l'ADN. La présence des dimères Ku va engendrer le recrutement de deux DNA-PKcs (pour DNA-dependent protein kinase) à chaque extrémité de la cassure pour ainsi former le complexe DNA-PK (Singleton et al. 1999). Une fois activés, les DNA-PKcs vont venir phosphoryler XRCC4 permettant d'activer le complexe de ligation XRCC4/Ligase IV (Critchlow, Bowater, and Jackson 1997; Sharma et al. 2016) qui s'associe à la protéine XLF (pour XRCC4-like factor) (Ahnesorg, Smith, and Jackson 2006) afin de permettre, dans un premier temps, de joindre les bouts francs de la séquence non codante pour former une boucle d'excision (Malu et al. 2012). Les structures en épingle à cheveux générées au niveau des extrémités codantes vont être prises en charge par le complexe Artemis/DNA-PK (Figure 10 étape 2) (Ma et al. 2002; Goodarzi et al. 2006). Artemis a une activité exonucléase 5'→3' et une activité endonucléase lorsqu'il est couplé au complexe DNA-PK (Schlissel 2002). Elle va ainsi cliver les structures en épingles à cheveux créant des séquences palindromiques (Ma et al. 2002) qui vont conduire à l'ajout de nucléotides au niveau des jonctions V-D et D-J pour les chaînes lourdes et de la jonction V-J pour les chaînes légères. Il a été montré qu'Artémis est un acteur clé pour cette étape. En effet, des études ont montré que la mutation d'Artemis est retrouvée chez des patients souffrant du syndrome DICS (déficit immunitaire combiné sévère) qui est une maladie héréditaire rare caractérisée par un affaiblissement du taux de LB et de LT

A.

	TRAV	TRAJ	TRBV	TRBD	TRBJ
Humain	41 (TRAV1 à V41)	61 (TRAJ1 à J61)	30 (TRBV1 à V30)	2 (TRAD1 et D2)	2 (TRAJ1 et J2)
Souris	23 (TRAV1 à V23)	61 (TRAJ1 à J61)	31 (TRBV1 à V31)	2 (TRAD1 et D2)	2 (TRAJ1 et J2)

B.

	IGHV	IGHD	IGHJ
Humain	7 (IGHV1 à V7)	7 (IGHD1 à D7)	6 (IGHJ1 à J6)
Souris	16 (IGHV1 à V16)	6 (IGHD1 à D6)	4 (IGHJ1 à J4)

	IGKV	IGKJ	IGLV	IGLJ
Humain	7 (IGKV1 à V7)	5 (IGKJ1 à J5)	11 (IGLV1 à V11)	7 (IGLJ1 à J7)
Souris	20 (IGKV1 à V20)	5 (IGKJ1 à J5)	3 (IGLV1 à V3)	4 (IGLJ1 à J4)

Tableau 4: Répartition en familles des segments V, D et J codant les chaînes lourdes et légères du TCRαβ et du BCR.

A. Nombre de familles de segments V, D et J codant les chaînes légères α et lourdes β du TCR chez l'Homme et la souris

B. Nombre de familles de segments V, D et J codant les chaînes légères et lourdes du BCR chez l'Homme et la souris

Entre parenthèses est signalée l'appellation donnée aux différentes familles de segments.

D'après Giudicelli et al 2005 et http://www.imgt.org/.

favorisant la survenue d'infections opportunistes graves et récurrentes (Moshous et al. 2001; Dalal and Tasher 2012).

C- Création de la diversité de jonction

La coupure des structures en épingles par Artemis va permettre à une autre protéine, exprimée spécifiquement par les lymphocytes, d'intervenir, la TdT (pour terminal deoxynucleotidyl transferase) (Figure 10 étape 3). TdT est une ADN polymérase qui interagit avec les protéines Ku au niveau de son domaine BRCT (pour BRCA1 C Terminus) (Mahajan et al. 1999) et ajoute de manière aléatoire des nucléotides aux extrémités 3' libres des séquences codantes. Ces nucléotides non génomiques sont appelés N-nucléotides. Cette addition nucléotidique aux extrémités des séquences codantes augmente la diversité du répertoire TCR et BCR. Une étude a montré que des souris knock-out pour TdT présentaient une diminution de la diversité du TCR d'environ dix fois par rapport aux souris contrôles (Cabaniols et al. 2001). Ce résultat montre l'importance de l'addition de N-nucléotides par la TdT pour la création d'un répertoire TCR diversifié. L'activité de TdT est visible au niveau des jonctions V-D et D-J de la chaîne β ainsi qu'au niveau de la jonction V-J de la chaîne α du TCR, même si son activité diminue fortement lors du réarrangement de la chaîne α (Cabaniols et al. 2001). En revanche TdT n'agit pas au niveau des jonctions des chaînes légères des Ig, l'enzyme intervient uniquement au niveau des jonctions V-D et D-J de la chaîne lourde des Ig (Benedict et al. 2000). Globalement, les activités des enzymes RAG, Artémis et TdT vont permettre d'augmenter la diversité au niveau des jonctions entre segments géniques, permettant ainsi de créer un répertoire naïf de récepteurs à l'Ag déjà très diversifié.

En revanche, il est important de souligner qu'en raison de la nature imprécise des enzymes intervenant dans ce processus, il est susceptible de produire des chaînes TCR/BCR non fonctionnelles. En effet, l'activité même des enzymes RAG, Artemis et TdT, qui aboutit à la délétion ou à l'insertion de nucléotides au niveau des jonctions, peut conduire dans deux tiers des cas à un décalage du cadre de lecture (Malu et al. 2012). Ce décalage du cadre de lecture est susceptible d'engendrer l'apparition d'un codon stop prématuré ou de modifier la séquence en acide aminé des régions constantes, aboutissant ainsi à la synthèse de chaînes non fonctionnelles.

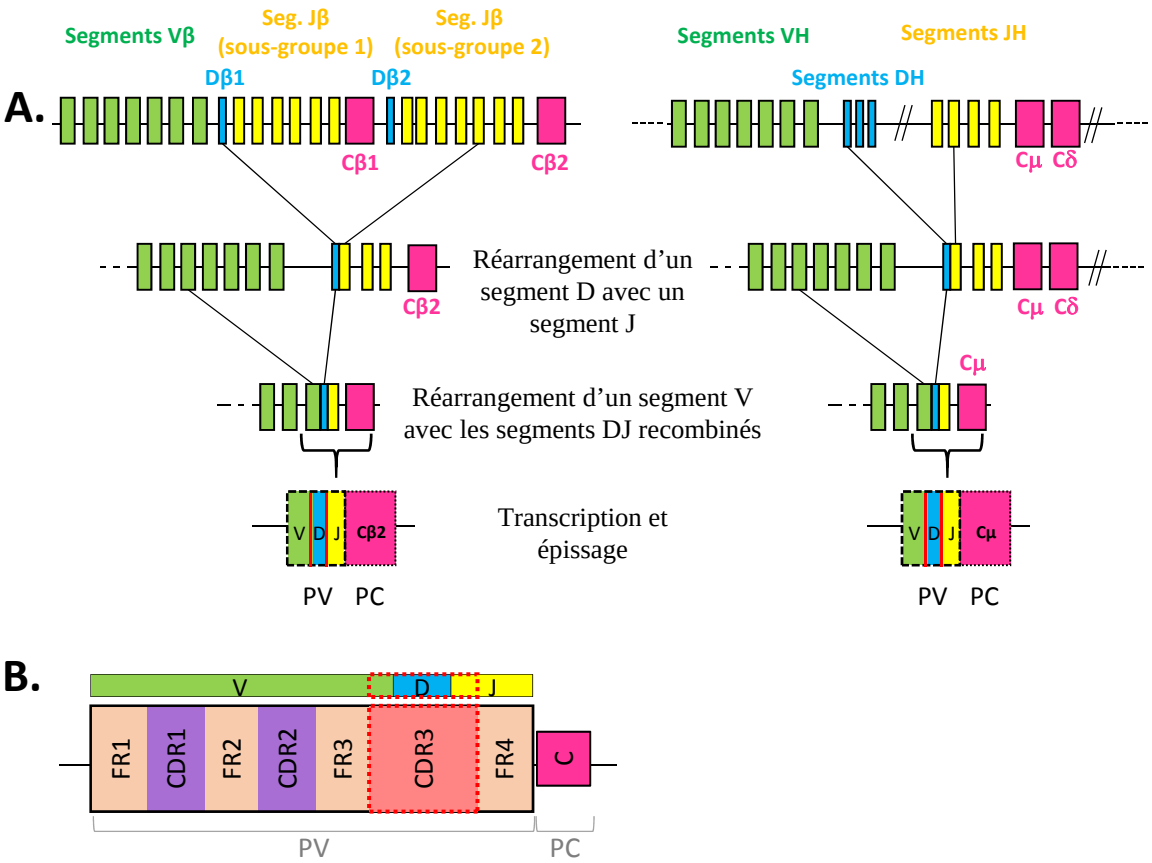


Figure 9: Schéma de la recombinaison V(D)J et du transcrit final d'une chaîne lourde de récepteur à l'antigène.

A. Recombinaison V(D)J de la chaîne lourde du TCR (schéma de gauche) et de la chaîne lourde du BCR (schéma de droite). La chaîne lourde est la première chaîne a être réarrangée lors de la lymphopoïèse. La recombinaison débute par l'association aléatoire d'un segment D (pour diversité) avec un segment J (pour jonction). Un segment V (pour variable) est ensuite associé aléatoirement à l'ensemble DJ pour former la partie variable du récepteur (PV). Le transcrit synthétisé lors de la recombinaison V(D)J correspond à l'association des segments recombinés V-D-J et contient également le segment C qui compose la partie constante (PC) du récepteur. La traduction de l'ARN messager génère la chaîne lourde du récepteur. Les étapes sont identiques pour la recombinaison des chaînes légères sauf qu'il n'y a pas de segment D.

B. Représentation des régions hypervariables CDR1, 2 et 3 d'une chaîne lourde de récepteur à l'Ag. La partie variable contient trois régions hypervariables CDR, aussi appelées régions déterminant la complémentarité, séparées par des régions dites « framework » (FR1 à 4) ou région charpente qui permettent un maintien de la structure.

D- Finalisation de la réparation des brins d'ADN et expression des récepteurs à l'antigène

La recombinaison V(D)J se termine par le recrutement d'une polymérase de la famille des pol X suivis du complexe de ligation XRCC4-DNA ligase IV pour finaliser la ligation des segments géniques V, D (pour les chaînes lourdes) et J (Figure 10 étape 4).
Le segment C codant la partie constante des récepteurs est associé par épissage aux segments géniques en dehors du processus de recombinaison. Pour le BCR, les deux premiers gènes C transcrits sont Cμ, dans la majorité des cas, et Cδ, plus rarement du fait de leur localisation sur le locus IgH en aval des segments JH (Figure 8). Ceci implique que les premiers isotypes exprimés sur le LB sont les IgM en majorité et les IgD plus rarement (Geisberger, Lamers, and Achatz 2006). Les autres isotypes seront exprimés après rencontre avec l'Ag par le processus de commutation de classe (Kracker and Radbruch 2004).

1.2.2.4- Régulation de la recombinaison V(D)J

Même si la recombinaison V(D)J est un mécanisme essentiel assurant la mise en place du SI adaptatif et de la diversité des récepteurs antigéniques, il reste cependant un mécanisme potentiellement dangereux en raison de la génération de cassures double brins de l'ADN. Les défauts de la recombinaison V(D)J sont à l'origine d'un large éventail de maladies allant des déficits immunitaires à l'apparition de lymphomes (Craig H. Bassing, Swat, and Alt 2002). Dans le but d'éviter au mieux les erreurs liées au processus de recombinaison V(D)J, il existe différents niveaux de régulation.

A- Règle 12/23 et séquences RSS

La recombinaison V(D)J est un processus finement régulé. En effet, il existe différents mécanismes qui vont influencer le recrutement des protéines RAGs et leur activité. Le premier niveau de régulation de la recombinaison V(D)J est lié à la règle 12/23 de Tonegawa qui implique que seuls deux segments ayant des RSS différentes (espaceur de 12 et 23 pb) peuvent

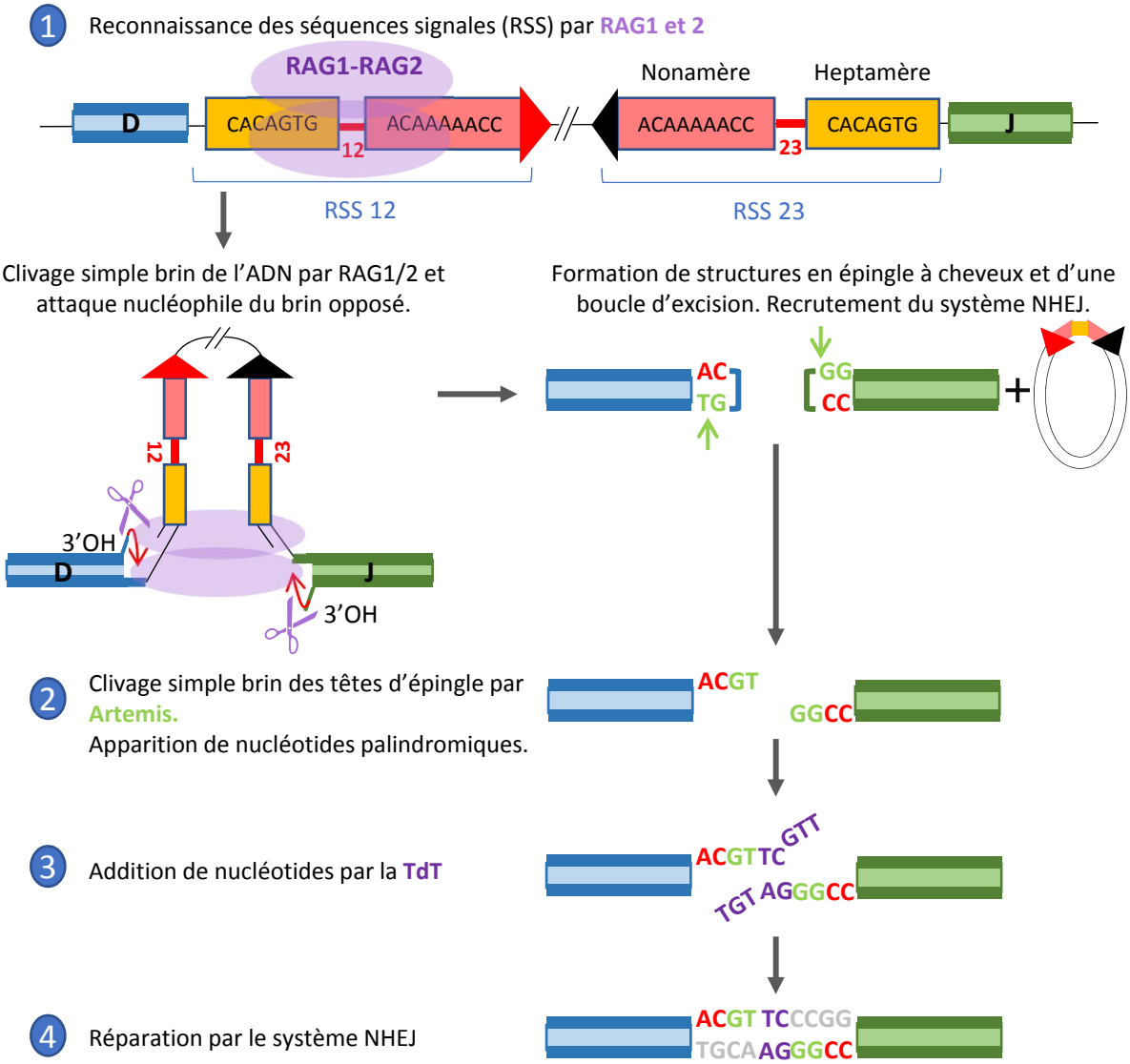


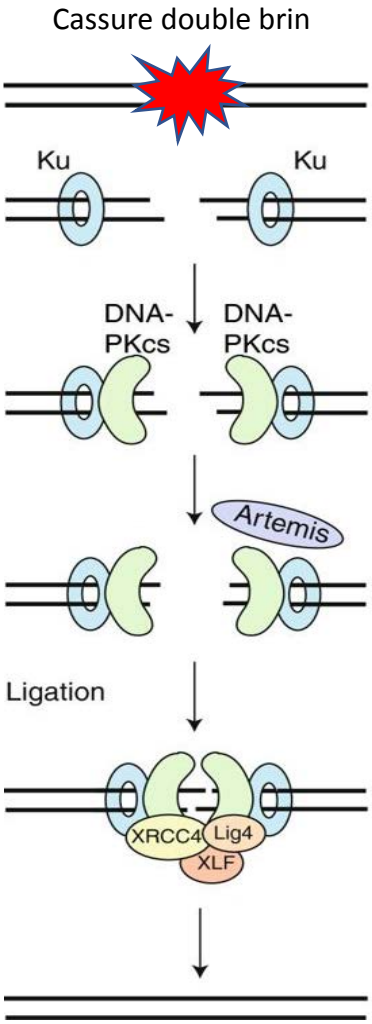
Figure 10: Représentation schématique des différentes étapes de la recombinaison V(D)J.

Le processus de recombinaison V(D)J fait intervenir des séquences appelées 'séquences signales de recombinaison' ou RSS situées au niveau de l'extrémité 3' des segments V, de part et d'autre des segments D et à l'extrémité 5' des segments J. Ces dernières sont constituées d'un heptamère et d'un nonamère séparés par un espaceur de 23 (RSS 23) ou 12 nucléotides (RSS 12). Les protéines RAG 1 et RAG 2 vont réaliser une coupure simple brin de l'ADN entre la séquence codante des segments à réarranger et les heptamères des RSS (**1**). Cette coupure engendre la formation d'une extrémité 3'OH libre qui participe à la réaction de trans-estérification sur le brin opposé et forme ainsi des structures en épingle à cheveux aux extrémités des segments et des bouts francs au niveau des RSS. La cassure double brin de l'ADN causée par les protéines RAGs induit le recrutement du système de réparation de l'ADN NHEJ (pour Non Homologous End Joining). Artemis est recrutée et coupe les structures en épingles à cheveux créant ainsi des séquences palindromiques libres (**2**). Ensuite, intervient l'ADN polymérase TdT qui catalyse l'addition aléatoire de nucléotides aux extrémités 3' libres des segments (**3**). Le système NHEJ recrute ensuite des polymérases de la famille des pol X suivis du complexe de ligation XRCC4-DNA ligase IV pour finaliser le réarrangement en liant les segments codant entre eux (**4**).

être réarrangés (Tonegawa 1983). Cette restriction permet de prévenir les réarrangements aberrants en forçant la reconnaissance de deux segments géniques compatibles. Cependant la règle 12/23 n'est pas à elle seule responsable du choix correct des segments géniques à recombiner. En effet, l'étude du réarrangement d'un mini-locus transgénique, introduit dans des cellules non lymphoïdes, et composé d'un segment Vβ associé à un RSS-23, un segment Dβ associé à un RSS-12 en 5' et un segment Jβ également associé à un RSS-12, a montré que la RSS-12 du Dβ, et non la RSS-12 du Jβ, était capable d'effectuer un réarrangement avec la RSS-23 du Vβ malgré la compatibilité avec la règle 12/23 entre les segments Vβ et Jβ (Sleckman et al. 2000; C. H. Bassing et al. 2000). Ces études ont mis en évidence un niveau de régulation supplémentaire, la restriction B12/23 (pour Beyond 12/23) qui assure l'utilisation du segment génique D lors du réarrangement des chaînes lourdes des récepteurs aux antigènes. Cette régulation est liée à la séquence même des RSS, plus particulièrement des nonamères situés au niveau 5' des segments D et de leurs espaceurs, dont la modification partielle ou totale des séquences engendre une diminution voire une abolition du réarrangement entre les segments D et V (Hughes et al. 2003). De plus, il a été montré qu'une mutation au niveau des RSS ou au niveau des espaceurs engendre une altération de l'activité de clivage de l'ADN par les RAGs due à une altération de l'interaction RAG-ADN (Olaru et al. 2004), montrant ainsi l'importance des séquences nucléotidiques des RSS. Cependant, il est important de noter que cette reconnaissance peut être erronée par des séquences RSS cryptiques (ou cRSS) qui correspondent à des séquences d'ADN proches des séquences RSS authentiques. Ces cRSS, associées à des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur, vont être reconnues par les protéines RAGs, aboutissant ainsi à une recombinaison illégitime, responsable de la survenue de certains lymphomes (Papaemmanuil et al. 2014; Roth 2014).

B- Régulation transcriptionnelle des protéines RAGs

Les protéines RAGs sont des facteurs hautement régulés au cours du développement lymphocytaire ce qui constitue une autre ligne de régulation de la recombinaison. En effet, les protéines RAGs sont exprimées de façon différentielle durant le développement des lymphocytes. Le taux de transcription des RAGs est élevé durant le réarrangement des chaînes constituant le TCR et le BCR mais diminue lorsque le processus de recombinaison est terminé (Nagaoka, Yu, and Nussenzweig 2000). Il a également été montré que les protéines RAGs



D'après Brandsma and Gent 2012

Figure 11: Intervention du système de réparation NHEJ lors de la recombinaison V(D)J

La cassure double brin de l'ADN générée par les protéines RAGs engendre le recrutement du système de réparation NHEJ. Ce système débute par la fixation de deux protéines, Ku70 et Ku80, au niveau des extrémités de la cassure de l'ADN permettant de les protéger. La présence des dimères Ku va engendrer le recrutement de deux DNA-PKcs (pour DNA-dependent protein kinase) à chaque extrémité de la cassure qui vont activer le complexe de ligation XRCC4/Ligase IV et le recrutement de la protéine XLF (pour XRCC4-like factor) afin de permettre la ligature des extrémités. Les structures en épingle à cheveux générées au niveau des extrémités codantes vont être prises en charge par le complexe Artemis/DNA-PK qui va cliver ces structures. Le recrutement d'une polymérase de la famille des pol X suivi du complexe de ligation XRCC4-DNA ligase IV permet de finaliser la ligation des extrémités d'ADN.

étaient exprimées différemment durant le cycle cellulaire pour éviter d'insérer des mutations dans l'ADN qui pourraient être délétères à l'organisme. C'est pourquoi l'expression des protéines RAGs est élevée durant la phase G0/G1 (phase de quiescence/croissance des cellules) avant de fortement diminuer (de 5 et 20 fois pour RAG1 et RAG2 respectivement) avant l'entrée des cellules en phase S (duplication du génome) jusqu'en phase M (division cellulaire) (Lin and Desiderio 1994). De plus, différents acteurs impliqués dans la régulation de l'expression des RAGs ont été décrits dans la littérature. Parmi eux se trouve un élément régulateur du locus RAG nommé Erag. Erag est activé uniquement dans les cellules B et sa délétion entraîne un blocage du développement des cellules B au stade pro-B (Hsu et al. 2003). Erag active le promoteur de RAG1/2 et permet leur expression lors de la lymphopoïèse B. Un autre élément régulateur, activant le promoteur de RAG2, nommé D3, a été décrit pour être actif dans toutes les cellules lymphoïdes et possède de nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription lymphoïdes tels que Lyf-1 et C/EBP (X.-C. Wei et al. 2002). D'autres éléments régulateurs en cis ont été identifiés tels qu'ASE (pour « anti-silencing element ») trouvé uniquement dans les LT et Ep trouvé uniquement dans les LB (Kuo and Schlissel 2009). Ces éléments régulateurs limitent donc l'expression des protéines RAG aux lymphocytes.

C- Accessibilité du locus et remodelage de la chromatine

Dans la cellule, l'ADN est présent sous forme de chromatine, c'est-à-dire d'ADN et de protéines qui lui sont associées. La compaction de l'ADN sous forme de chromatine est permise grâce aux complexes histones. Ceux-ci sont composés de 8 sous-unités correspondant à 4 histones différents présents en 2 exemplaires chacun (H2A, H2B, H3 et H4). L'association histones-ADN est stabilisée par l'histone linker H1 (Figure 12 A) (Füllgrabe, Hajji, and Joseph 2010; Henikoff 2008), l'ensemble formant le nucléosome. Les histones ont une structure centrale globulaire par laquelle ils interagissent entre eux, tandis que leurs extrémités N et C terminales, aussi appelées queues d'histones, sont libres. Ces dernières sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, phosphorylation et ubiquitination) mais la majorité de ces modifications sont situées sur les queues N-terminales des histones (Spivakov and Fisher 2007; Shukla, Vaissière, and Herceg 2008). L'ensemble de ces modifications forme le code histone qui intervient dans la régulation du degré de compaction de la chromatine pour aboutir à l'état actif ou répressif de la

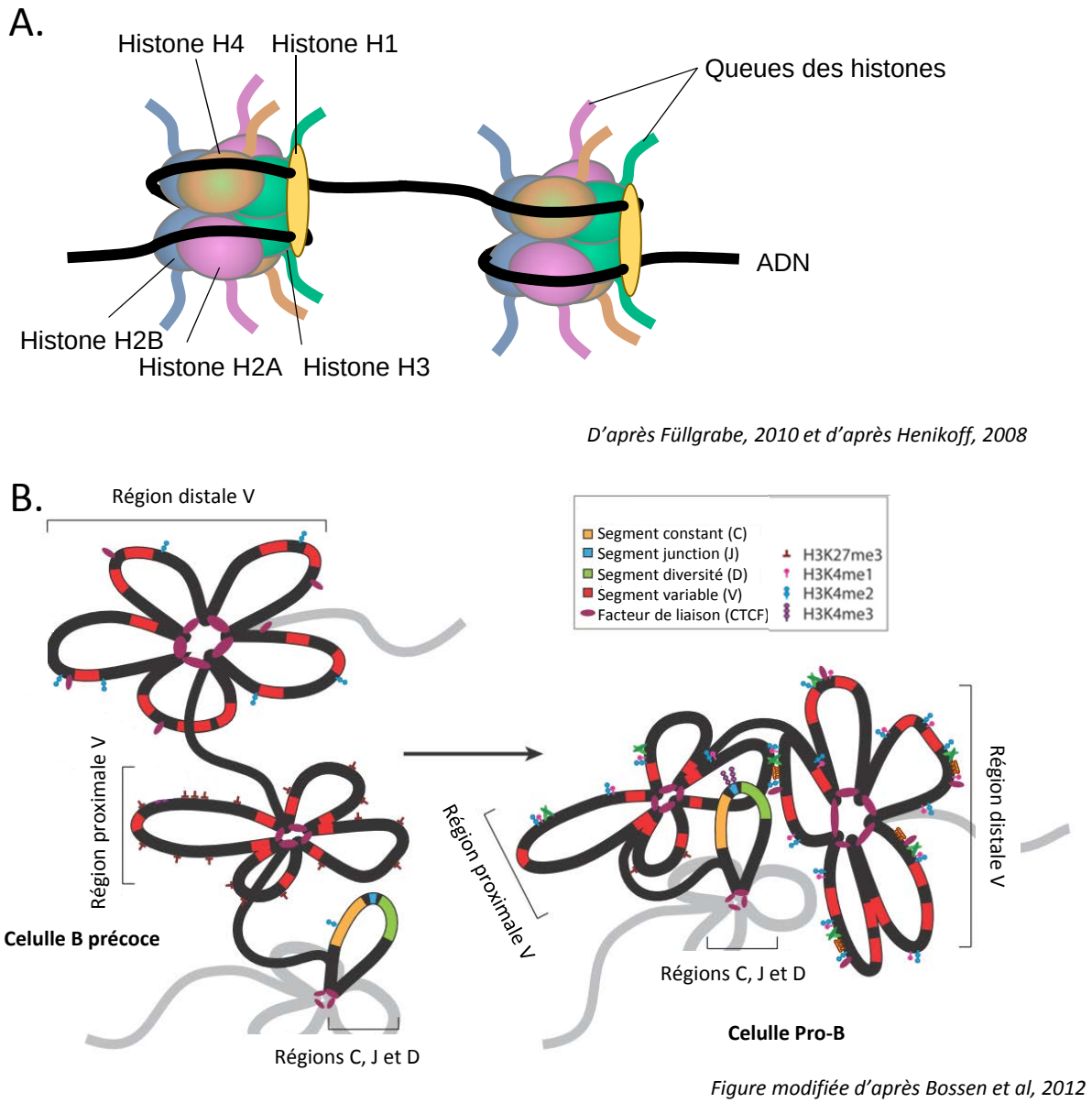


Figure 12: Représentation schématique d'un nucléosome et exemples de modifications post-traductionnelles des histones

A. Représentation schématique d'un nucléosome composé de 8 sous-unités de 4 histones différents, H2A, H2B, H3 et H4. L'association histones-ADN est stabilisée par l'histone linker H1. Les histones ont une structure centrale globulaire par laquelle ils interagissent entre eux, tandis que leurs extrémités N et C terminales sont libres.

B. Schéma des principales modifications post-traductionnelles des histones retrouvées sur le locus IgH et décrites comme intervenant dans la régulation de la recombinaison V(D)J. Le locus IgH se compose de trois structures multi-boucles en forme de rosette distinctes dans les cellules B précoces. Au cours de la différentiation cellulaire, ces structures se compactent sur elles-mêmes, notamment grâce à la régulation du remodelage de la chromatine *via* les modifications post-traductionnelles des histones, permettant ainsi un rapprochement des régions du locus les plus éloignées durant le processus de recombinaison V(D)J.

transcription (Lennartsson and Ekwall 2009). Certaines de ces modifications sont connues comme étant des marques répressives de la transcription comme la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 et d'autres comme des marques actives de la transcription comme la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (Lennartsson and Ekwall 2009). Ces modifications sont également des signaux nécessaires au recrutement de complexes protéiques et jouent le rôle de plateforme pour ces derniers (Mariño-Ramírez et al. 2005; Hu et al. 2018). Dans le cas de la recombinaison V(D)J, la régulation de la structure chromatinienne participe notamment au rapprochement des régions du locus les plus éloignées (Bossen, Mansson, and Murre 2012) et les modifications post-traductionnelles ont été associées au choix des segments lors de la recombinaison (C.-R. Xu et al. 2008; Subrahmanyam et al. 2012) (Figure 12 B). De plus, des études ont montré que les modifications post-traductionnelles des histones influençaient l'accessibilité des protéines RAG sur le locus à recombiner. Matthews et ses collaborateurs ont montré que l'initiation de la recombinaison V(D)J était permise grâce à la reconnaissance de la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) *via* le motif en doigt de zinc de la protéine RAG2 (Matthews et al. 2007). Une autre étude a montré que l'éviction transitoire des histones H2A et H2B au niveau des segments codant les chaînes légères des Ig, permettait aux RSS d'être découverts et d'être reconnus par les protéines RAG, autorisant ainsi ces dernières à débuter leur activité nucléasique (Bevington and Boyes 2013) (Figure 12 B).

La structure de la chromatine peut également être régulée par la méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN est essentiellement associée à une répression transcriptionnelle. Cette modification consiste en l'ajout de groupements méthyl au niveau des bases cytosines, préférentiellement localisées dans des régions riches en GC (régions de plus de 200 bp comprenant au moins 50% de bases GC), appelées îlots CpG. La méthylation de l'ADN est différemment régulée lors de la recombinaison V(D)J. En effet, il a été montré qu'avant l'initiation de la recombinaison V(D)J, les segments DH et JH des Ig sont méthylés pour être ensuite déméthylés lors de leur réarrangement (Selimyan et al. 2013). Le produit DH-JH formé est également déméthylé durant le processus de recombinaison, lui permettant ainsi d'être réarrangé avec un segment VH. De plus, la méthylation de l'ADN participe activement à la régulation du processus de recombinaison V(D)J puisqu'il a été montré que la méthylation de l'heptamère des RSS inhibe l'activité de clivage du complexe RAG1/RAG2 (Nakase, Takahama, and Akamatsu 2003). Ceci est notamment dû à la reconnaissance de mCpG par les protéines

MBD (methyl-CpG binding domain) qui bloquent l'interaction des RAGs avec les RSS. Ainsi les modifications de la chromatine vont influencer fortement la recombinaison V(D)J.

D- Exclusion allélique

A la surface de chaque lymphocyte est exprimé un récepteur spécifique et unique. De ce fait, les chaînes lourdes et légères des récepteurs TCR et BCR sont produits à partir d'un seul chromosome. Ce phénomène est assuré par le mécanisme d'exclusion allélique. Il a été montré que le choix de l'allèle soumis à la recombinaison V(D)J n'est pas lié à l'origine maternel ou paternel de l'allèle, éliminant ainsi l'empreinte génomique en tant que régulateur potentiel pour ce processus étroitement régulé (Gebert et al. 2017). Lors du réarrangement des chaînes lourdes, une première recombinaison est tentée sur l'un des deux chromosomes pris au hasard. Si la recombinaison est réussie, c'est-à-dire si une chaîne lourde fonctionnelle est synthétisée, le second chromosome ne sera pas recombiné et ne sera pas exprimé. Si au contraire, la tentative de recombinaison conduit à la synthèse d'une chaîne non fonctionnelle, une nouvelle recombinaison est tentée sur l'autre chromosome. Si ce dernier réarrangement conduit à nouveau à un produit non fonctionnel, le lymphocyte mourra par apoptose. En revanche, si le réarrangement est productif, la cellule reçoit un signal de survie, prolifère et le même scénario se reproduira avec les chromosomes codant les chaînes légères. Ce processus est en fait permis par la diminution et l'accessibilité des protéines RAG sur le deuxième chromosome empêchant ainsi la recombinaison V(D)J de redémarrer (Brady, Steinel, and Bassing 2010).

L'exclusion allélique permet donc à chaque lymphocyte de posséder à leur surface un seul type de récepteur exprimé en plusieurs exemplaires (c'est-à-dire que les lymphocytes expriment plusieurs récepteurs ayant une chaîne lourde et une chaîne légère identique). Ceci a effectivement été montré pour les LT qui expriment à leur surface des TCR formés d'un seul réarrangement productif de la chaîne β (Casanova et al. 1991). En revanche, l'exclusion allélique lors de la recombinaison de la chaîne α ne semble pas être aussi précise puisque plus d'1/3 des LT périphériques exprimeraient à leur surface deux TCR différents, associant une même chaîne β à deux chaînes α différentes suite à la recombinaison des deux allèles α (Padovan et al. 1993; Alam, Crispe, and Gascoigne 1995).

Il est intéressant de souligner que pour les LB, qui peuvent exprimer différentes classes d'immunoglobulines ou isotypes, il existe un phénomène, appelé l'exclusion isotypique, qui permet à chaque LB d'exprimer des BCR formés d'un seul type de chaîne légère (chaîne κ ou λ) ainsi que d'un seul type de classe ou sous-classe de chaîne lourde.

1.2.3- Origine et maturation des lymphocytes

1.2.3.1- Origine embryonnaire des lymphocytes

Le développement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez l'Homme et la souris débute dans le sac vitellin à partir du 16ème et du 7ème jour de vie fœtale respectivement. Les cellules souches hématopoïétiques apparaissent ensuite dans l'aorte dorsale de la région Aorte-Gonades-Mésonéphros (AGM) au 11ème jour de développement chez la souris (E. Taylor, Taoudi, and Medvinsky 2010) et entre le 27ème et le 42ème jour de développement chez l'Homme (Tavian et al. 2010). Le sac vitellin et l'AGM sont à l'origine de lignées cellulaires du sang différentes. En effet, les précurseurs du sac vitellin généreraient des érythrocytes, des cellules myéloïdes et des cellules NK alors que les progéniteurs de la région AGM génèreraient à la fois des cellules B et des cellules T (Grzywacz, Miller, and Verneris 2010). Les précurseurs hématopoïétiques vont ensuite coloniser le foie fœtal à partir du 23ème jour de grossesse chez l'Homme et du 10ème jour de gestation chez la souris (Houssaint 1981; Fontaine-Perus et al. 1981; Tavian and Péault 2005). Les CSH vont ensuite migrer vers la moelle osseuse à partir de la 11ème semaine chez l'Homme et à partir du 17ème jour embryonnaire chez la souris (Chotinantakul and Leeanansaksiri 2012). C'est dans la moelle osseuse qu'aura lieu durant toute la vie de l'individu, la maturation des lymphocytes B naïfs.

À partir de la 9ème semaine embryonnaire chez l'Homme (Haynes et al. 1988) et du 12ème jour de gestation pour la souris, les précurseurs des cellules T, ou pro-thymocytes, migrent dans le thymus *via* la circulation sanguine (Amagai, Itoi, and Kondo 1995). La migration des pro-thymocytes de la moelle osseuse vers le thymus est permise grâce à des chémokines telles que CXCL12 et CCL25 dont les récepteurs sont sous l'influence des protéines kinases JAK (Janus Kinase) (Soldevila et al. 2004). Ces cellules finiront leur maturation à l'intérieur du thymus et conduiront à la production des cellules matures T naïves.

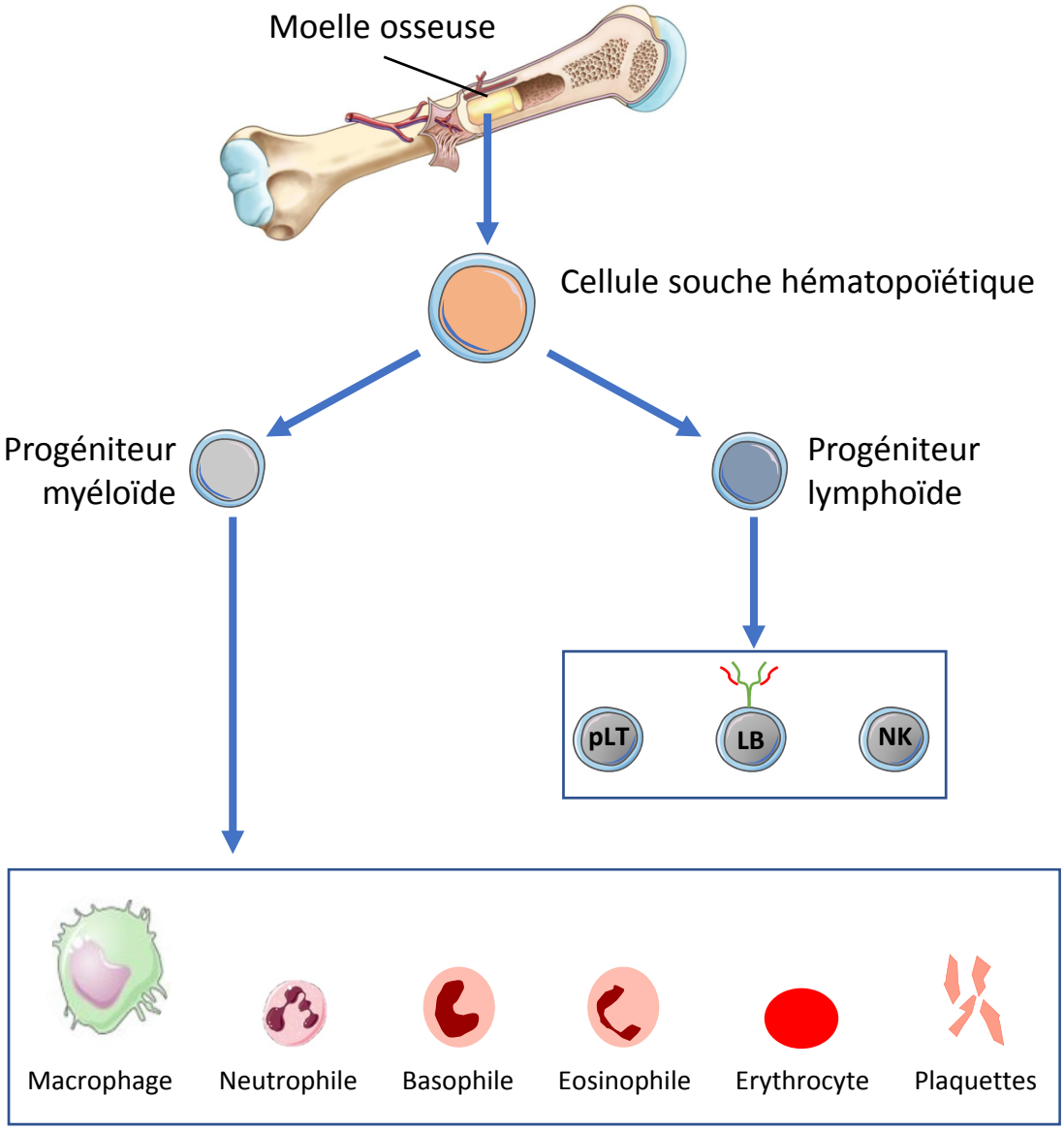


Figure 13: Représentation schématique de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse correspond au développement de l'ensemble des cellules sanguines. Au cours de l'hématopoïèse, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en deux types de progéniteurs, les progéniteurs myéloïdes et les progéniteurs lymphoïdes. Les progéniteurs myéloïdes sont à l'origines des érythrocytes, des autres leucocytes (neutrophiles, macrophages, basophiles et éonisophiles) et des plaquettes. Quant aux progéniteurs lymphoïdes, ils donnent naissance aux cellules natural killer (NK) et aux lymphocytes T (LT) et B (LB). Seules les NK et les LB continueront leur maturation au sein de la moelle osseuse. En revanche pour les cellules T, les précurseurs (pLT ou pré-thymocytes) provenant des progéniteurs lymphoïdes, vont quitter la moelle osseuse pour rejoindre le thymus où ils finiront leur maturation pour donner des lymphocytes T matures.

1.2.3.2- Lieu de développement des lymphocytes : Organes lymphoïdes primaires

Les lymphocytes T et B acquièrent leurs fonctions effectrices dans les organes lymphoïdes primaires avant de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires dans lesquels ils vont exercer leur pouvoir de défense contre les pathogènes. Les organes lymphoïdes primaires (OLP) sont composés de la moelle osseuse, du thymus ainsi que du foie fœtal durant le développement embryonnaire (Figure 2). Dans ces organes, les lymphocytes prolifèrent et se différencient à partir des progéniteurs lymphoïdes dans le but d'acquérir leur immunocompétence et d'être capable de reconnaitre les Ag (Hirose et al. 2002). Le processus de maturation dans les OLP est appelé lymphopoïèse. Les progéniteurs lymphocytaires sont issus des CSH présentes dans la moelle osseuse. Ces progéniteurs vont ensuite se différencier en LB ou en LT. Dans le cas des LT, la lymphopoïèse s'effectue au sein du thymus tandis que pour les LB, la lymphopoïèse s'effectue dans la moelle osseuse. Suite à leur maturation dans les OLP, les lymphocytes vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) *via* la circulation sanguine (Stevens, Weissman, and Butcher 1982).

A- La moelle osseuse

La moelle osseuse se présente sous deux formes, la moelle rouge et la moelle jaune. La moelle rouge situe dans les os plats (côtes, vertèbres, bassin, etc) et dans la partie épiphysaire des os longs. Le rôle majeur de la moelle rouge est la production des cellules sanguines, ou hématopoïèse, à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). La moelle jaune se situe quant à elle à l'intérieur des os longs au sein de la cavité médullaire. Elle est essentiellement composée d'adipocytes. Avec l'âge, la moelle jaune remplace peu à peu la moelle rouge mais son rôle est encore peu connu (Prabhakar, Ershler, and Longo 2009). La moelle osseuse renferme un microenvironnement médullaire constitué d'un ensemble de cellules non hématopoïétiques comme des adipocytes, des ostéoblastes, des ostéoclastes et des cellules endothéliales. Ce microenvironnement est organisé sous forme de niches hématopoïétiques à l'intérieur desquels se déroule les différentes étapes de maturation des cellules sanguines (Isern and Méndez-Ferrer 2011). Ces niches assurent la maintenance et la régulation des fonctions des cellules souches grâce à la sécrétion par les cellules stromales de facteurs de croissance ou cytokines essentiels au développement des CSH comme la chimiokine CXCL12

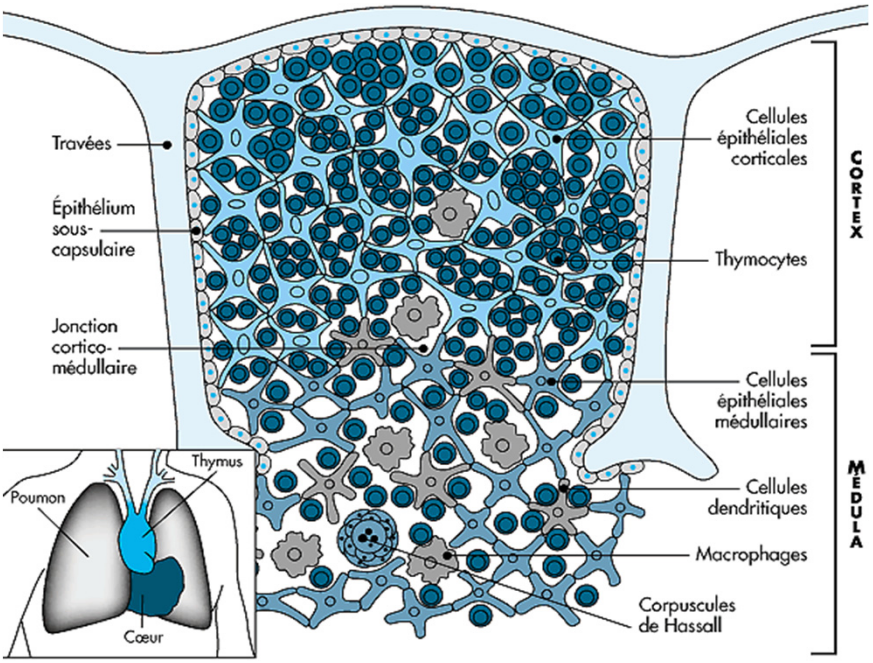


Figure 14: Organisation générale d'un lobule thymique

Les lobules sont séparés par des travées conjonctives. Ils contiennent deux zones, le cortex en périphérie qui contient des petits thymocytes immatures dans une trame de cellules épithéliales et la médulla au centre qui contient des thymocytes matures dans un réseau moins dense de cellules épithéliales et de cellules dendritiques.

D'après *Berrih-Aknin et al, 1999*

(ou SDF-1 pour « stromal cell derived factor 1 ») sécrétée par les cellules stromales, qui va se lier au récepteur CXCR4 présent à la surface des CSH et jouer un rôle dans la rétention et la différentiation des progéniteurs hématopoïétiques (Panaroni and Wu 2013; Nagasawa 2015). Au cours de l'hématopoïèse, les CSH se différencient en deux types de progéniteurs, les progéniteurs lymphoïdes, qui donneront après maturation les cellules NK, les lymphocytes T et B et les progéniteurs myéloïdes qui sont à l'origines des érythrocytes, des autres leucocytes (granulocytes, monocytes, macrophages) et des plaquettes (Figure 13). Au sein de la moelle osseuse a lieu la maturation des lymphocytes B qui se développent à partir des précurseurs lymphoïdes communs. En revanche pour les cellules T, les précurseurs (ou pré-thymocytes), vont quitter la moelle osseuse pour rejoindre le thymus où ils finiront leur maturation pour donner des lymphocytes T matures (Sambandam et al. 2008).

B- Le thymus

Le thymus est une glande endocrine située dans la partie supérieure du thorax. Chez l'Homme, le thymus est complètement formé à la naissance alors que chez la souris sa structure définitive n'est atteinte que vers la 4ème semaine après la naissance. Il est constitué de deux lobes reliés entre eux par du tissu conjonctif et chacun divisés en lobules (Figure 14). La partie périphérique constitue le cortex et la partie interne constitue la médulla (Figure 14). La maturation des cellules T débute dans le cortex et se termine dans la médulla avant que les cellules matures rejoignent la circulation sanguine (Berrih-Aknin and Eymard 1999). La migration cortex-medulla des cellules T en développement est notamment permise *via* le récepteur de chimiokine CCR7, présent à leur surface, qui se lie aux molécules CCL19 et CCL21 sécrétés par les cellules stromales du thymus (Ueno et al. 2004).

1.2.3.3- La lymphopoïèse T

A- Les stades de développement

Durant la lymphopoïèse T, les cellules vont acquérir et perdre certains marqueurs de surface, ce qui rend possible leur distinction au cours du développement. Les **progéniteurs T** (ou pré-thymocytes) sont issus du même progéniteur commun à l'origine des cellules B et siègent donc au sein de la moelle osseuse avant de rejoindre la partie corticale du thymus où se déroulera

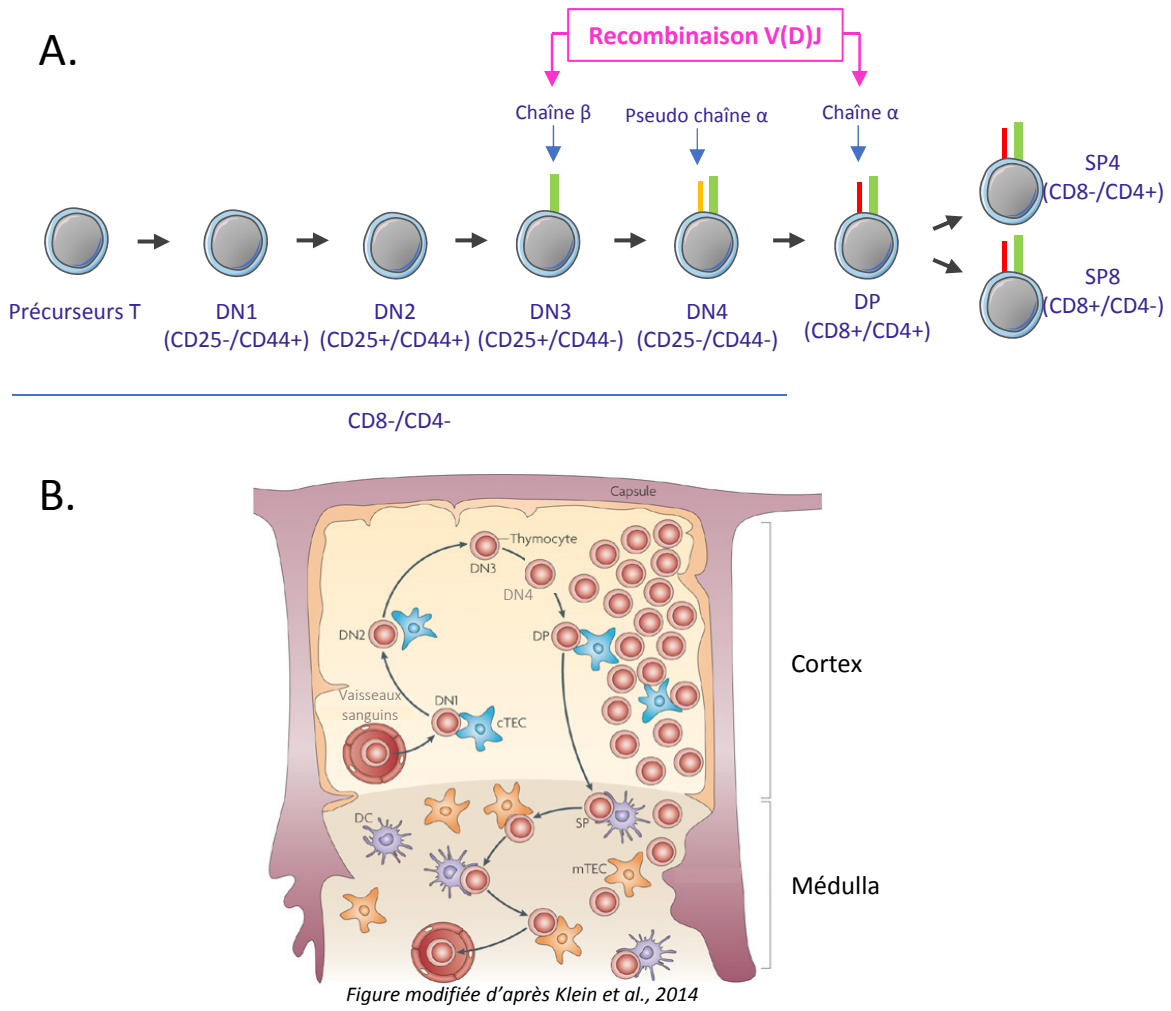


Figure 15: Représentation schématique de la lymphopoïèse T.
A. La lymphopoïèse T est la maturation, à partir de cellules souches hématopoïétiques, des LT helper CD4+ et des LT cytotoxiques CD8+. Les précurseurs T vont se différencier en cellules doubles négatives (DN) pour les marqueurs CD4 et CD8 où débute la recombinaison V(D)J de la chaîne β du TCR. La chaîne β va s'associer avec une pseudo chaîne α qui sera ensuite remplacée par une vraie chaîne α. Ces cellules vont ensuite se différencier en cellules doubles positives (DP) pour les marqueurs CD4 et CD8. A ce stade, le réarrangement de la chaîne légère est terminé et le TCR est mature. Au cours de la dernière étape de maturation, les cellules vont exprimer l'un ou l'autre des marqueurs CD4/CD8, elles sont alors au stade simple positif CD4+ ou simple positif CD8+ (SP) et vont rejoindre la circulation périphérique.
B. Au cours de la lymphopoïèse, les progéniteurs T provenant de la moelle osseuse arrivent dans le thymus au niveau de la partie corticale *via* la circulation sanguine. Les progéniteurs se différencient en cellules DN où va s'effectuer la β sélection permettant de sélectionner les LT avec une chaîne β fonctionnelle. Les cellules DN passant la β sélection se différencient ensuite en cellules DP qui vont être soumises à la sélection positive. Cette dernière consiste à sélectionner les cellules T capables de reconnaître les molécules du CMH à la surface des cellules épithéliales corticales thymiques (cTEC) qui sont associées à un peptide du soi. Les cellules DP survivantes vont ensuite rejoindre la partie médullaire du thymus et vont cette fois subir la sélection négative. Cette sélection négative fait intervenir les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTEC) et les cellules dendritiques (DC) qui vont présenter aux LT des antigènes du soi afin qu'ils acquièrent la tolérance vis-à-vis du soi. Au final, seulement 5% des cellules T en développement passeront l'ensemble des sélections thymiques et deviendront des cellules matures SP qui quitteront ensuite le thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires *via* la circulation sanguine.

l'ensemble des étapes de maturation des LT. Ces progéniteurs T vont tout d'abord se différentier en cellules dites **double négatives (DN)**. Cette appellation fait référence à l'absence d'expression des protéines membranaires CD4 et CD8. C'est à ce stade que s'effectue la recombinaison V(D)J des chaînes lourdes et légères du TCR. Les cellules DN vont ensuite se différencier en **cellules double positives (DP)** pour les marqueurs CD4 et CD8. Entre le stade DN et DP, les cellules T vont exprimer transitoirement le marqueur CD8, ces cellules sont alors appelées **cellules immatures simples positives CD8 ou ISP8** (Tan et al. 2011). Les cellules DP vont ensuite migrer vers la zone médullaire du thymus pour donner les **cellules matures simples positives (SP)** qui vont exprimer à leur surface un des deux co-récepteurs CD4 (SP4) ou CD8 (SP8) (Figure 15 A et B). Cette transition cortico-médullaire est permise par l'interaction du récepteur CCR7 et de ses ligands CCL19 et CCL21 sécrétés par les cellules stromales du thymus (Ueno et al. 2004) ainsi que par l'interaction de la protéine plexinD1 avec son ligand, semaphorin3E, fortement exprimé au niveau de la zone médullaire du thymus (Y. I. Choi et al. 2008). Les cellules SP vont ensuite quitter le thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires *via* la circulation sanguine. Les cellules simples positives CD4 sont à l'origine des LTh et les cellules simples positives CD8 sont à l'origine des LTc.

B- Les sous-populations doubles négatives et l'évolution de leur phénotype au cours de la lymphopoïèse T

Les cellules DN peuvent être subdivisées en quatre grandes sous-populations cellulaires (DN1 à DN4), différenciables grâce à l'expression des marqueurs CD25 (récepteur à l'IL2) et CD44 (impliqué dans la migration et la différenciation cellulaire) (Föger, Marhaba, and Zöller 2000). La transition DN1-DN2 est visualisée par l'expression du récepteur à l'IL2 impliqué dans la prolifération et la protection contre l'apoptose des cellules DN (Cong et al. 2016). Les cellules DN1 (CD44+/CD25-) et DN2 (CD44+/CD25+) constituent les cellules pro-T qui se différencient ensuite en cellules DN3 (CD44-/CD25+) puis DN4 (CD44-/CD25-) constituant les cellules pré-T. Par ailleurs, chaque sous-population négative peut être subdivisée en différents sous-groupes de cellules DN en fonction de l'expression de différents marqueurs. En effet, les cellules DN1 peuvent être subdivisées en 5 sous-groupes (DN1a à DN1e) en fonction du niveau d'expression de c-kit et CD24 : DN1a (c-kit^{+}/CD24^{-}), DN1b (c-kit^{+}/CD24^{+}), DN1c (c-kit^{int}/CD24^{-}), DN1d (c-kit^{-}/CD24^{+}) et DN1e (c-kit^{-}/CD24^{-}). Les cellules DN1a et DN1b donnent naissances aux cellules

T alors que les cellules DN1c, d et e donnent naissances à des cellules non T comme les NK et les DCs thymiques (Braunstein and Anderson 2012). Parmi les cellules DN2 se distinguent deux sous-groupes, DN2a (lck^{-}/c-kit^{hi}) et DN2b (lck^{+}/c-kit^{int}) différenciables par l'expression de lck et c-kit. Les cellules DN2a donnent naissances à des cellules non T (NK, DC) alors que les cellules DN2b se différencient uniquement en cellules T (Braunstein and Anderson 2012). Les cellules DN3 et DN4 ont, quant à elles, 3 niveaux de maturations différenciables grâce à l'expression différentielle des marqueurs CD25 et CD28 (Teague et al. 2010): DN3a (CD25^{hi}/CD28^{lo}), DN3b (CD25^{hi}/CD28^{int}), DN3c (CD25^{int}/CD28^{int}), DN4a (CD25^{lo}/CD28^{int}), DN4b (CD25^{lo}/CD28^{hi}) et DN4c (CD25^{lo}/CD28$^{- \text{ ou } lo}$).

C- Les étapes de la recombinaison V(D)J au cours de la lymphopoïèse T

Comme nous l'avons dit précédemment, la recombinaison V(D)J se déroule au stade DN de la lymphopoïèse T. Plus précisément, c'est au stade DN2 que débute le réarrangement de la chaîne β du TCR par l'association du segment Dβ avec Jβ. L'association du segment Vβ avec DβJβ s'effectue quant à elle au stade DN3 (Outters et al. 2015). Le stade DN3 correspond également à la formation du complexe CD3, qui débute dans le réticulum endoplasmique avant de s'associer à la chaîne β du TCR (Alarcon et al. 1988). Ensuite, la chaîne β réarrangée va s'apparier avec le complexe CD3 et un substitut de chaîne α (pTα ou pseudo-chaîne α) pour former le pré-TCRβ (H. von Boehmer and Fehling 1997). Entre le stade DN3a et DN3b s'effectue la « β sélection » qui correspond à un événement permettant uniquement la survie des cellules T possédant une chaîne β de TCR fonctionnelle. Si la chaîne β est fonctionnelle, le pré-TCR va émettre un signal de survie à la cellule T, lui permettant de se différencier en cellule DN4 (Haks et al. 1999). Puis, les cellules DN4 vont se différencier en cellules ISP8 puis DP. C'est au stade DP que s'effectue le réarrangement la chaîne α du TCR (Harald von Boehmer 2005). Une fois le TCR formé, les cellules DP donnent naissance aux cellules SP4/SP8 qui vont rejoindre la circulation sanguine.

D- Les régulateurs de la lymphopoïèse T

Molécule	Fonction	Progé-niteur T	DN1	DN2	DN3	DN4	DP	SP4/ SP8
Notch1	Signalisation							
Kit	Signalisation							
IL-7R	Récepteur à l'IL-7 facteur de croissance							
E2A/HEB	Facteur de transcription							
CD3	Signalisation							
CD44	Molécule d'adhésion							
CD25	Récepteur à l'IL-2 facteur de croissance et d'activation							
CD4	Co-récepteur							
CD8								
TCRβ	Reconnaissance antigénique							
TCRα								

Figure 16: Expression de molécules de surface et de gènes impliqués dans le développement des lymphocytes T

La maturation des cellules T implique l'expression différentielle de nombreux régulateurs dont les fenêtres d'expression sont indiquées en orange.

Un certain nombre de régulateurs sont reconnus pour jouer un rôle déterminant dans l'engagement et la différentiation des cellules T (Figure 16) (Van de Walle et al. 2016; Longabaugh et al. 2017). Seulement quelques-uns d'entre eux sont décrits dans le paragraphe suivant.

Au cours de la maturation précoce des cellules T intervient la chimiokine CXCR4 (exprimée à la surface des cellules T) et son ligand CXCL12 (exprimé par les cellules thymiques stromales dans le cortex) qui jouent un rôle important dans la migration des progéniteurs T de la moelle osseuse vers le thymus (Figure 15 B). En effet, l'étude de Plotkin et ses collègues a montré que la mutation de CXCR4 empêchait la migration des progéniteurs T sanguins vers la partie corticale du thymus ce qui entraîne un blocage des cellules T au stade DN1 (Plotkin et al. 2003). De plus, d'autres études ont montré que la maturation précoce des LT était également sous l'influence de la signalisation par Notch-1. Le récepteur Notch est une glycoprotéine membranaire qui, après avoir lié son ligand (Delta-like ou Jagged), va subir un clivage libérant son domaine intracellulaire (Deftos and Bevan 2000; Yang, Jeremiah Bell, and Bhandoola 2010). Ce domaine va ensuite migrer vers le noyau des cellules et former, avec d'autres facteurs, un complexe transcriptionnel capable de réguler l'expression d'un grand nombre de gènes cibles tel que *Hes1*, essentiel à la maturation des cellules T aux stades DN et au réarrangement du TCR (Tomita et al. 1999) et l'*IL7R*, indispensable à la maturation et aux étapes de sélections des LT fonctionnels (González-García et al. 2009). La voie de signalisation Notch-1 joue également un rôle essentiel dans l'inhibition du développement des cellules non-T pour promouvoir l'engagement des CSH vers la lignée T (Rothenberg 2017). L'inactivation inductible de Notch1 chez la souris, engendre un blocage sévère du développement des cellules T au stade progéniteur T – DN1 et engendre le développement de cellules B au sein du thymus (Radtke et al. 1999; A. Wilson, MacDonald, and Radtke 2001). Inversement, l'activation inductible de la voie Notch-1 induit un développement ectopique de lymphocytes T dans la moelle osseuse ainsi qu'un blocage de la différenciation des cellules B (Pui et al. 1999). De plus, l'activation inductible de la voie Notch dans les OLP de poulet induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire des cellules B (Morimura et al. 2000). L'ensemble de ces résultats montrent l'importance du récepteur Notch dans le développement des LT au détriment de la lignée B.

La maturation tardive des LT est sous l'influence d'autres régulateurs dont les facteurs de transcription E2A et HEB qui forment l'hétérodimère E2A-HEB. L'étude de Zhuang a montré

que l'hétérodimère E2A-HEB est impliqué dans la transition DP-SP et plus particulièrement dans le développement des cellules DP en cellules T CD4+ (Jones-Mason et al. 2012). Cet hétérodimère est également important dans les stades plus précoces du développement des LT puisqu'il a été montré que la mutation du gène *HEB* ou *E2A* induit un blocage précoce du développement des LT plus particulièrement au stade DN3 (Bain et al. 1994; Barndt, Dai, and Zhuang 2000). De plus, il est actuellement connu que l'hétérodimère E2A-HEB se lie aux sites E-box présents au niveau d'éléments régulateurs des loci du TCR, régulant ainsi l'accessibilité des segments codant les chaînes du TCR lors de la recombinaison V(D)J (Barndt, Dai, and Zhuang 2000; Agata et al. 2007).

Enfin, de nombreux autres acteurs, comme Bcl11b, GATA3, Kit, etc, ont été reconnus pour jouer un rôle essentiel dans le développement des cellules T (Yang, Jeremiah Bell, and Bhandoola 2010; Ng et al. 2018).

E- Les phases de sélections

Le processus de recombinaison V(D)J à l'origine de la formation du TCR n'est pas infaillible, il est susceptible de produire des TCR non productifs ou même autoréactifs. Pour pallier ces erreurs, l'organisme a mis en place différents points de contrôle durant la lymphopoïèse T, on parle de sélections thymiques.

E.1- La β sélection

Après formation du pré-TCR au stade DN3, les cellules vont subir une première phase de sélection appelée la β-sélection. Cette sélection consiste à éliminer par apoptose les cellules possédant une chaîne β de TCR non fonctionnelle. Les cellules ayant une chaîne β fonctionnelle complexée à une pseudo-chaîne α (pTα) et au complexe CD3 seront dans la capacité de générer un signal autonome qui va conduire à leur survie et à la possibilité de progresser vers le stade DN4 (Yamasaki and Saito 2007). Les éléments constituants le pré-TCR jouent un rôle différent dans le processus de β sélection. Des études ont montré que chez des souris pTCRα -/- (ne possédant pas la pseudo chaîne α) le développement des cellules T est altéré et les LT sont partiellement bloqués au stade DN3, montrant ainsi l'importance de la pseudo chaîne α dans le développement des cellules DN3 (Fehling et al. 1995). De plus, le pré-

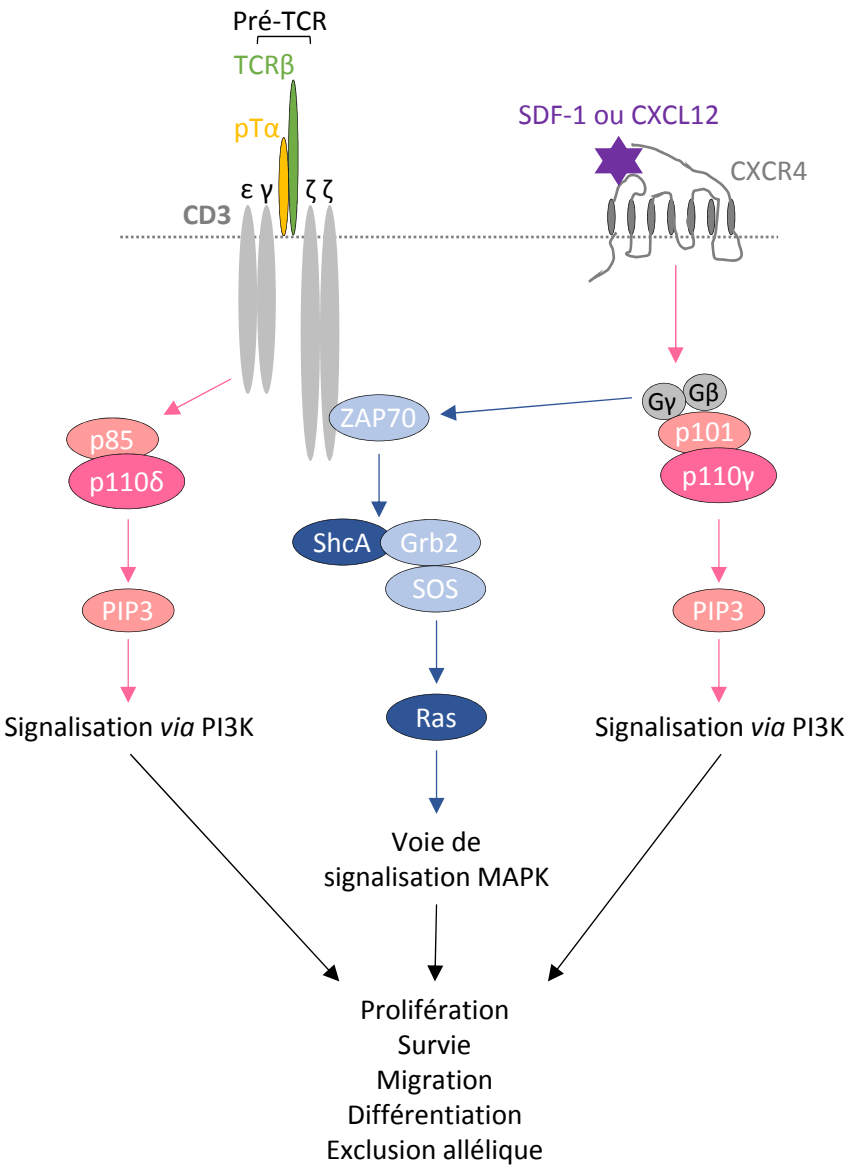


Figure 17: Voies de signalisation mises en place lors de la β sélection.

La signalisation coopérative entre le pré-TCR et CXCR4, qui empruntent les voies de signalisation PI3K et MAPK, sont nécessaires à la survie des cellules T lors de la β sélection. La signalisation PI3K du pré-TCR est médiée par l'isoforme de classe IA p110δ et la sous-unité p85. La phosphorylation de CD3 ε et de la tyrosine kinase ZAP70 conduit à la phosphorylation de la molécule adaptatrice ShcA. Une fois la molécule ShcA activée, cette dernière s'associe avec Grb2 et le facteur SOS pour initier la signalisation Ras / MAPK.

La liaison de la chimiokine SDF-1, ou CXCL12, à son récepteur CXCR4 initie également les voies de signalisation MAPK et PI3K. CXCL12 stimule l'association physique de CXCR4 et du TCR et utilise les domaines ITAM de liaison ZAP-70 du TCR pour la transduction du signal. La signalisation médiée par PI3K de CXCR4 est principalement médiée par l'isoforme p110γ de classe IB et sa sous-unité régulatrice p101 qui se lie aux sous-unités Gβγ qui sont libérées lors de l'activation de CXCR4. L'ensemble de ces voies permettent la différenciation continue des lymphocytes T, leur prolifération, la survie cellulaire, la migration cellulaire ainsi que l'exclusion allélique au locus TCRβ.

TCR joue un rôle important dans le processus d'exclusion allélique puisqu'il a été montré qu'en absence de pTα, le nombre de thymocytes portant deux réarrangements productifs était multiplié par 7 (Aifantis et al. 1997). En revanche la pseudo-chaîne α n'est pas impliquée dans la signalisation pré-TCR puisque l'administration d'un anticorps anti CD3ε chez des souris double KO pTα$^{-/-}$ *x* RAG $^{-/-}$ suffit à restaurer le développement des cellules T (H. J. Fehling et al. 1997). Une autre étude a montré le rôle essentiel du complexe CD3 dans la survie et la différentiation des cellules DN en DP. Pour cela, Jacobs et ses collègues ont traité des souris RAG1-/- (dont le TCR n'est pas réarrangé) avec un anticorps dirigé contre la chaine ε du CD3 et ont observé que les cellules T étaient capables de passer la β sélection et de se développer en cellules DP (Jacobs et al. 1994). Cette étude montre que la signalisation intra-cellulaire *via* le complexe CD3 est primordiale pour la survie des LT au cours de la β sélection. Les voies de signalisation activées à partir du pré-TCR sont extrêmement complexes et diversifiées, on trouve notamment la voie des MAP kinase et celle de la Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Figure 17) dont l'activation correcte va aboutir à la survie, à la prolifération et à la différentiation des cellules DN3 (Michie and Zúñiga-Pflücker 2002; Janas and Turner 2010). D'autres molécules sont également impliquées dans les signaux de survie des LT lors de la β sélection comme la chimiokine CXCL12 (exprimée par les cellules épithéliales corticales du thymus) qui après fixation à son récepteur CXCR4 (exprimé à la surface des cellules T immatures) va activer l'enzyme PI3K et d'autres molécules de la voie MAPK (Kumar et al. 2006; Janas and Turner 2010) (Figure 17). De plus, le récepteur CXCR4 agirait comme co-stimulateur du pré-TCR et leur interaction permettrait à CXCR4 d'augmenter son potentiel chimiotactique et au pré-TCR d'induire une régulation à la hausse de l'expression de gènes anti-apoptotiques indispensables à la survie des thymocytes et à leur développement en thymocytes DN4 (Trampont et al. 2010).

E.2- Les sélections positive et négative

Pour éviter que les lymphocytes ne s'activent en présence des molécules du soi au sein de l'organisme, provoquant ainsi la survenue de maladies auto-immunes, l'organisme a mis en place un système permettant de sélectionner uniquement les cellules T ayant acquis une tolérance au soi. Pour cela, les cellules T vont subir deux sélections successives, la sélection positive suivie de la sélection négative.

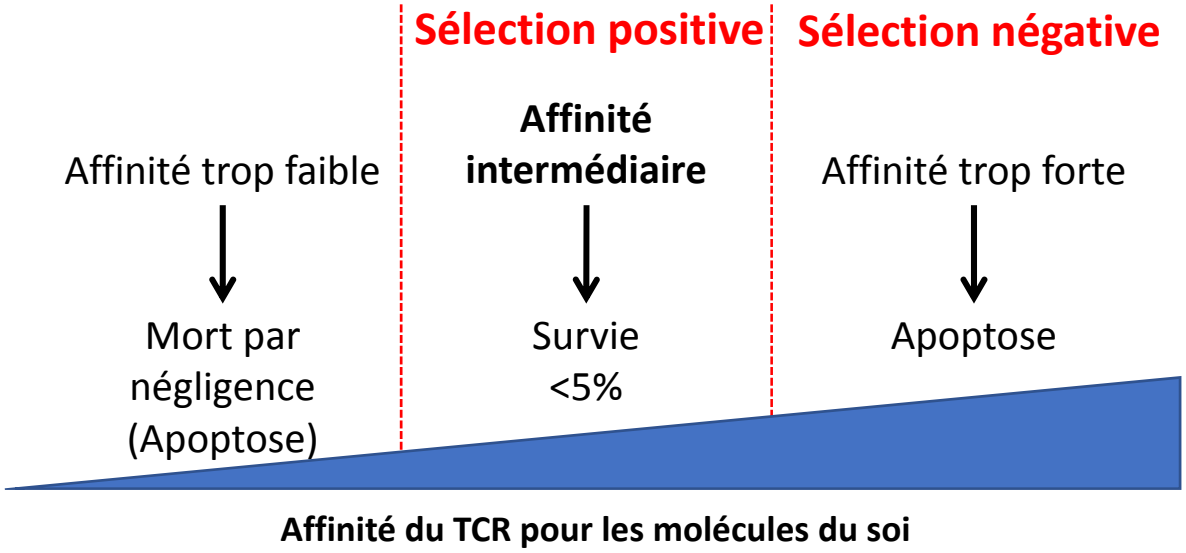


Figure 18: Modèle d'affinité du TCR lors des sélections thymiques

L'affinité du TCR pour les complexes CMH-peptide du soi retrouvés à la surface des cellules épithéliales thymiques est déterminant lors des processus de sélections thymiques. Les cellules DP portant un TCR avec une faible affinité pour le complexe CMH-peptide mourront par négligence car aucun signal intracellulaire de survie ne sera transmis à la cellule. En revanche, les cellules portant un TCR d'affinité intermédiaire pour le complexe recevront un signal de survie et continueront leur maturation, c'est la sélection positive. Cependant, dans le cas où l'affinité des TCR pour les complexes est trop forte, les cellules mourront par apoptose afin d'éviter qu'elles ne soient par la suite autoréactives, c'est ce que l'on appelle la sélection négative.

E.2.1- Sélection positive

La sélection positive s'effectue au niveau de la partie corticale du thymus qui abrite les cellules épithéliales corticales thymiques (cTEC) et va entrainer la mort par apoptose d'environ 75-80% des cellules T (Yates 2014). La sélection positive consiste à sélectionner les cellules T capables de reconnaître les molécules du CMH à la surface des cTEC qui sont associées à un peptide du soi (pCMH). A ce jour, les mécanismes impliqués dans la sélection positive ne sont pas totalement élucidés. Il est d'ores et déjà connu l'importance des cTECs dans ce processus de sélection. Ces dernières agissent en tant que CPA et expriment une variété de complexes pCMH lors de la sélection positive. L'importance des cTECs dans la sélection positive a été montrée par l'équipe de Justin Van De Wiele qui a travaillé sur des souris transgéniques ne présentant que des molécules de CMHI au niveau des cellules corticales du thymus (de ce fait, aucune cellules de la partie médullaire du thymus ne possédaient de molécule de CMHI à leur surface) (Capone et al. 2001). Cette étude a montré que la sélection positive des cellules T CD8+ des souris transgéniques était normale mais hautement autoréactive. Ces résultats indiquent que les cTECs peuvent induire la sélection positive des LT mais ne sont pas capables d'induire la tolérance du soi, suggérant ainsi que la sélection négative s'effectuerait exclusivement au niveau des cellules de la partie médullaire du thymus (Capone et al. 2001). Des résultats similaires ont été constatés pour les cellules CD4+ (Laufer et al. 1996).

Le destin d'un LT au stade DP, lors de la sélection positive, dépend du degré d'affinité/avidité de son TCR pour un pCMH (Ludger Klein et al. 2009) (Figure 18). Les DP ayant un TCR de faible affinité pour son pCMH sont éliminés (mort par négligence). Il en est de même pour ceux possédant une affinité trop grande (délétion clonale ou sélection négative), car ils sont susceptibles d'être d'autoréactifs face au soi. Seuls les LT avec une affinité intermédiaire reçoivent un signal de survie et peuvent poursuivre leur maturation.

Il est à noter qu'au stade DP les lymphocytes T n'expriment ni le récepteur à IL-7 (Yu et al. 2006), ni le facteur de survie Bcl-2 (Gratiot-Deans et al. 1994) ce qui les prédestinent fortement à la mort. Seul un signal de survie permettrait aux cellules DP d'échapper à l'apoptose et de continuer leur maturation.

La sélection positive fait intervenir de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire comme les chaînes δ et ζ du complexe CD3, ou encore les molécules

appartenant à la voie ERK (Starr, Jameson, and Hogquist 2003). D'autres facteurs, comme E2A et HEB, ont été montrés comme étant impliqués dans le blocage des cellules DP jusqu'à ce qu'elles reçoivent un signal de sélection positive *via* leur TCR (M. E. Jones and Zhuang 2007). En effet, la déficience en E2A entraîne un passage des cellules DP vers le stade SP avec des TCR non fonctionnels, aboutissant au développement d'un lymphome à cellules T (Bain et al. 1997; M. E. Jones and Zhuang 2007).

Il est important de noter que le peptide associé au CMH à la surface des cTECs n'induit pas la sélection d'un TCR spécifique à ce peptide mais permet la sélection de TCR différents structurellement, capables de reconnaitre différents Ag. En effet, des études menées sur des souris transgéniques possédant des molécules de CMH-I (B. Wang et al. 2009) ou II (Ignatowicz, Kappler, and Marrack 1996) liées de façon covalente à un peptide défini, ont montré que les TCR des LT périphériques présentaient une diversité de répertoire normale en termes d'usage des segments Vβ et qui plus est, étaient capables de reconnaitre d'autres peptides.

Finalement, la sélection positive s'accompagne d'une séparation entre les cellules SP4 restreintes aux molécules de CMH-II et SP8 restreintes aux molécules de CMH-I. L'analyse de souris transgéniques pour un TCR restreint à une molécule de CMH-I (Vugmeyster et al. 1998) ou bien à une molécule du CMH-II (Madsen et al. 1999) montre un bais évident pour la lignée T αβ CD8+ ou CD4+, respectivement.

E.2.2- Sélection négative

La sélection positive est donc une étape cruciale qui permet de ne garder que les LT capables de reconnaître les complexes CMH/peptide exprimés à la surface des cTECs. Cependant, lors de cette étape des LT autoréactifs peuvent être générés ce qui représente un danger pour l'organisme. La sélection négative va permettre de neutraliser ces cellules autoréactives et ainsi à mettre en place un premier niveau de tolérance appelée tolérance centrale. Les thymocytes positivement sélectionnés vont migrer vers la médulla où va s'effectuer la sélection négative. Cette migration est permise par la signalisation faisant intervenir le récepteur aux chimiokines CCR7 et ses ligands (Ueno et al. 2004). Selon le modèle classique d'affinité vu précédemment, les LT possédant une affinité trop forte pour le pCMH meurent par apoptose (délétion clonale). Les molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire

du TCR induisant la mort des LT autoréactifs sont nombreuses. Certaines voies de signalisation sont indispensables à la fois à la sélection positive et à la sélection négative comme la voie ERK. En revanche, certaines molécules de signalisations ont été montrées comme étant exclusives à la sélection négative comme Grb2 (Starr, Jameson, and Hogquist 2003). Par ailleurs, plusieurs types cellulaires sont impliqués dans la sélection négative. Parmi eux on trouve les cellules médullaires épithéliales thymiques (mTEC), les cellules dendritiques (DC) et les cellules B thymiques. L'origine et le mode de fonctionnement des cellules B thymiques soulèvent encore beaucoup de questions (Perera and Huang 2015) mais leur rôle dans la présentation antigénique induisant la sélection négative des cellules T a été démontré (Inaba et al. 1991). En revanche, le mécanisme d'action des mTECs et des DCs a été le sujet de nombreuses études. Ces cellules présentent sur leurs molécules du CMH, des Ag du soi exprimés au niveau des organes périphériques dans le but d'éliminer les LT qui répondent à des Ag du soi extérieur au thymus. L'expression ectopique de ces Ag par les mTECs est sous le contrôle de la protéine AIRE (AutoImmune REgulator) qui régule la transcription des gènes tissus-spécifiques dans le thymus, telle que l'insuline, qui sont généralement exprimés exclusivement dans des organes périphériques spécifiques (Anderson et al. 2002). La déficience d'AIRE chez l'Homme engendre un syndrome auto-immun appelé l'APECED (Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy) (Finnish-German APECED Consortium 1997). De la même manière, la déficience du facteur de transcription AIRE chez des souris engendre un développement accru d'anticorps auto-immuns (Ramsey 2002). Ces études montrent l'importance d'AIRE dans le processus de sélection négative des LT. AIRE est également impliqué dans le mécanisme de transfert d'Ag tissulaires spécifiques des mTEC vers les DCs (Hubert et al. 2011), permettant ainsi d'augmenter la probabilité de rencontre avec un thymocyte spécifique de l'Ag tissulaire présenté (Millet, Naquet, and Guinamard 2008). Il existe trois grandes populations de DC participant de manière différente à la délétion clonale des LT, comprenant une population de DC plasmacytoïdes (pDC) et deux populations de DC conventionnelles (cDC) comportant des DC résidentes dans le thymus et des DC migratoires provenant des organes périphériques et migrant vers le thymus (Wu and Shortman 2005). Les cDC résidentes seraient capables de capturer et de présenter les Ag présents dans le microenvironnement thymique dont des Ag amenés par la circulation sanguine ou provenant des mTEC (Proietto et al. 2008). Les pDC, malgré un pouvoir de présentation antigénique plus faible que les cDC, et les DC migratoires seraient capables de

capturer des Ag de la périphérie et de les transporter dans le thymus afin d'éliminer les LT spécifiques de ces Ag (Hadeiba et al. 2012; Ludger Klein et al. 2014). La capacité de l'ensemble de ces cellules à présenter un grand nombre d'Ag du soi différents permet d'améliorer l'efficacité de la sélection négative à évincer les LT autoréactifs. Au final, seulement 5% des cellules T en développement passeront l'ensemble des sélections thymiques (Starr, Jameson, and Hogquist 2003).

Malgré la mise en œuvre de ces processus de sélection, certaines cellules T autoréactives réussissent à passer les barrières de sélection et rejoignent la périphérie où elles peuvent potentiellement déclencher l'auto-immunité. Il existe par conséquent des mécanismes de tolérance périphérique pour protéger l'organisme contre ces cellules.

F- La tolérance périphérique

Certains thymocytes autoréactifs ne sont pas éliminés au niveau du thymus et réussissent à rejoindre la périphérie. La raison principale de l'échappement des thymocytes à la tolérance centrale est que certains Ag du soi exprimés en périphérie ne seraient pas ou peu exprimés au niveau thymique (L. Klein and Kyewski 2000). Pour pallier à ce défaut de sélection, plusieurs mécanismes existent en périphérie : l'anergie (inactivation du LT autoréactif), la délétion clonale, l'ignorance (le LT autoréactif ne s'active pas soit parce que l'Ag du soi est présent en trop petite concentration, soit parce que l'Ag du soi est séquestré dans des organes non vascularisés comme au niveau de la chambre antérieur de l'œil (Niederkorn 2003)) et la régulation par les LT régulateurs (inhibent la prolifération et la fonction des LT autoréactifs) et par les DC tolérogènes (induisent l'anergie des LT naïfs autoréactifs) (Schietinger and Greenberg 2014; Xing and Hogquist 2012). Il existe également un autre phénomène pour pallier les TCR autoréactifs appelé « editing ». Cet événement consiste à internaliser le récepteur TCR défectueux et à débuter le réarrangement génique d'un autre récepteur (Wagner 2007).

1.2.3.4- Lymphopoïèse B

A- Stades de développement

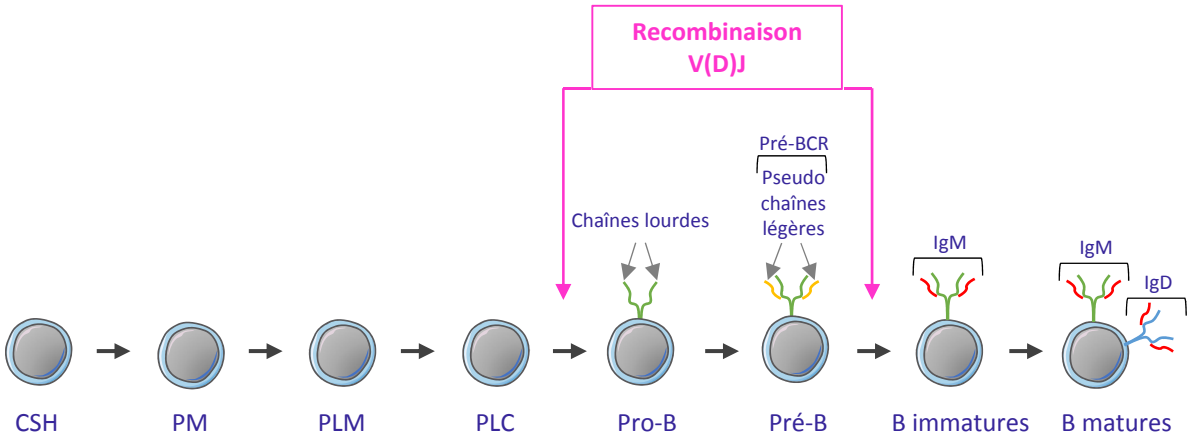


Figure 19: Représentation schématique de la lymphopoïèse B.

La lymphopoïèse B correspond à la maturation, dans la moelle osseuse, des cellules B à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces CSH vont donner naissance aux progéniteurs multipotents (PM) puis aux progéniteurs lymphoïdes multipotents (PLM) qui se différencient en cellules progénitrices lymphoïdes communes (PLC). Ces PLC vont se différencier en cellules pro-B où s'effectue le réarrangement des chaînes lourdes *via* le processus de recombinaison V(D)J. Les cellules pro-B se différencient en cellules pré-B où les chaînes lourdes s'associent à des pseudo chaînes légères pour former le pré-BCR. Au stade B immature, les pseudo chaînes légères sont remplacées par de vraies chaînes légères et donnent naissance à une IgM de surface. Les cellules B immatures se différencient ensuite en cellules B matures qui se caractérisent par la co-expression membranaire d'une IgM et d'une IgD. Ces cellules B matures vont ensuite rejoindre la circulation périphérique.

Comme nous l'avons vu précédemment, les CSH donnent naissance à deux grandes lignées cellulaires, la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde. La lignée lymphoïde donne naissance aux LT, qui maturent dans le thymus et aux LB qui eux maturent au sein de la moelle osseuse. La maturation des LB (ou lymphopoïèse B) dans la moelle osseuse, s'effectue à partir des **cellules souches hématopoïétiques (CSH)** qui sont capables de s'auto-renouveler, de reconstituer l'ensemble du système hématopoïétique (Figure 19) et de maintenir la production des cellules sanguines à l'état d'équilibre (Laurenti and Göttgens 2018). Ces CSH vont se différencier en cellules **progénitrices multipotentes (PM)**. Ces cellules ont la capacité de se différencier soit en cellules **progénitrices lymphoïdes communes (PLC)**, soit en cellules myéloïdes progénitrices. Les PLC sont restreints à la lignée lymphoïde et peuvent donner naissance aussi bien à des cellules B qu'à des cellules T (Kondo 2010). Du côté de la lignée B, les PLC vont donner naissance aux **cellules pro-B**. Le stade pro-B peut se diviser en deux sous-stades, le stade pré-pro-B et le stade pro-B tardif. Au stade pré-pro-B débute le réarrangement DH-JH de la chaîne lourde des Ig. Le stade pro-B tardif se caractérise par le réarrangement VH-DJH de la chaîne lourde. Une fois la chaîne lourde formée, les cellules pro-B se différencient en **cellules pré-B**. Ce stade pré-B comporte également deux sous-stades, le stade « grande pré-B » (ou « large pre-B ») et le stade « petite pré-B » (ou « small pre-B »). Au stade « grande pré-B » se forme le pré-BCR. Ce pré-BCR est composé de l'hétérodimère Igα/Igβ et de la chaîne lourde réarrangée, associée avec une pseudo chaîne légère, qui est elle-même constituée de l'association de deux protéines VpréB et λ5 (Mårtensson et al. 2010; M. Zhang, Srivastava, and Lu 2004). Si le pré-BCR est productif, il va émettre un signal de survie à la cellule, grâce à la signalisation *via* l'IL-7, lui permettant ainsi de proliférer (Marshall et al. 1998; Patton, Plumb, and Abraham 2014) et de poursuivre sa maturation vers le stade « petite pré-B ». A ce stade, s'effectue le réarrangement VL-JL sur le locus des chaînes légères (réarrangement de la chaîne κ puis réarrangement de la chaîne λ si les réarrangements κ ne sont pas fonctionnels) (M. van der Burg et al. 2002; Mårtensson et al. 2010). De la même manière que pour les LT, lorsque le premier réarrangement des chaînes lourdes et légères est productif sur le premier allèle, le second allèle va subir l'exclusion allélique (Christian Vettermann and Schlissel 2010). La chaîne légère créée va remplacer la pseudo-chaîne légère et une IgM de surface va alors être exprimée à la membrane de la cellule, les cellules sont alors appelées **cellules B immatures**. Ces cellules B immatures vont subir une sélection dite négative qui consiste à éliminer les cellules B autoréactives et à garder uniquement celles qui ont acquis la tolérance vis-à-vis du

soi (Sandel and Monroe 1999). Les cellules B immatures sélectionnées vont ensuite quitter la moelle et rejoindre les organes lymphoïdes secondaires dans lesquelles elles subiront des étapes supplémentaires de maturation pour donner naissance aux **cellules B matures naïves**, caractérisées par la co-expression des isotypes IgM et IgD (Chung, Silverman, and Monroe 2003).

B- Modification du phénotype au cours de la lymphopoïèse B

Au cours de la lymphopoïèse, les cellules acquièrent et/ou perdent l'expression de certaines protéines membranaires qui jouent un rôle dans l'acquisition des différentes fonctions lymphocytaires.

Les **CSH (Lin-/ Sca-1^{hi}/ c-kit^{hi}/ CD34+/ IL7Rα-/ Flt3-)** se caractérisent par l'absence de marqueurs de surface spécifiques des cellules matures, appelés « lineage » (ou Lin, qui regroupe un ensemble de marqueurs comme CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b et la glycophorine A). Les **PLC (Lin-/ Sca-1^{lo}/ c-kit^{lo}/ CD34+/ IL7Rα+/ Flt3+)** se distinguent des CSH, entre autre, par l'expression du récepteur à l'interleukine 7 (ou IL-7Rα), qui est essentiel à la survie et à la prolifération des cellules progénitrices B mais également indispensable à la maturation des cellules pro-B et qui se trouve impliqué dans le réarrangement des chaînes lourdes et légères des Ig (Bertolino et al. 2005; Clark et al. 2014). Au stade **pro-B (B220^{lo}/ CD19+/ CD43+/ IgM-)**, les cellules vont exprimer d'autres marqueurs de surface tels que B220 (ou CD45R, impliqué dans la modulation de la transduction du signal *via* le BCR (Justement 2001)), CD19 (jouant un rôle important dans la différentiation et la prolifération des cellules B (de Rie et al. 1989)), CD43 (impliqué dans l'adhésion et la survie cellulaire (Rosenstein, Santana, and Pedraza-Alva 1999)) et CD79a/CD79b (ou Igα/Igβ, constituant le module de transduction du signal). Au stade **pré-B (B220^{lo}/ CD19+/ CD43-/ IgM-)**, les cellules vont perdre l'expression de CD43 mais vont exprimer d'autres protéines de surface comme CD20 (dont le rôle est d'agir comme un canal à ions calciques qui va permettre de réguler l'activation des cellules B (Walshe et al. 2008)). Le passage du stade pré-B au stade **B immature (B220^{lo}/CD19+/ CD43-/ IgM+)** se traduit par l'expression de l'IgM de surface nouvellement formée. Le stade **B mature (B220^{hi}/CD19+/ CD43-/ IgM+)** se traduit, quant à lui, par une augmentation de l'expression de B220 ainsi que par l'apparition de l'expression

Molécule	Fonction	CSH	Pro-B	Pré-B	B immature	B mature
Flt3	Signalisation					
Kit	Signalisation					
IL-7R	Récepteur l'IL-7 facteur de croissance					
E2A/EBF	Facteur de transcription					
CD19	Signalisation					
B220	Signalisation					
CD43	Adhésion/survie					
CD79	Signalisation					
Lin	Marqueurs des cellules matures					
IgM	Reconnaissance antigénique					
Ikaros	Facteur de transcription					
Pax5	Facteur de transcription					

Figure 20: Expression des molécules de surfaces et de gènes impliqués dans le développement des lymphocytes B

La maturation des cellules B implique l'expression différentielle de nombreux régulateurs dont les fenêtres d'expression sont indiquées en orange.

de la protéine CD21, qui, avec CD19, participera à la transduction du signal intracellulaire lors de l'activation du LB (Tedder, Zhou, and Engel 1994).

C- Les différents régulateurs de la lymphopoïèse B

Comme pour la lymphopoïèse T, un grand nombre de régulateurs spécifiques intervient au cours de la lymphopoïèse B dans le but de contrôler les différentes étapes de maturation (Figure 20) (Laurenti et al. 2013).

L'étape de différenciation des CSH en cellules PM fait intervenir différentes protéines comme des chimiokines et des facteurs de transcription. En effet, le microenvironnement médullaire sécrète la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1 pour « Stromal cell Derived Factor 1) qui va se lier au récepteur CXCR4 présent à la surface des CSH et va ensuite va agir comme un facteur de croissance pour les précurseurs B (Nagasawa 2015). D'autres facteurs nécessaires au développement des CSH existent. Parmi eux se trouvent les facteurs de transcriptions PU.1 et Ikaros. La concentration de PU.1 influence l'engagement des CSH vers le lignée lymphoïde ou la lignée myéloïde (Hosokawa et al. 2018) et est essentielle pour le développement des progéniteurs multipotents au cours de l'hématopoïèse (Pang et al. 2018). Un taux d'expression faible de PU.1 corrèle avec l'entrée dans la voie lymphoïde, tandis qu'une expression élevée est associée à une entrée dans la voie myéloïde (DeKoter and Singh 2000). De plus, il a été montré que l'absence d'expression de PU.1 dans des embryons murins (*via*bles jusqu'à 18 jours de gestation seulement) engendre la perte d'expression des transcrits RAG1/RAG2 et de gènes spécifiques de la lignée B (comme *VpréB*) ainsi que l'absence de progéniteurs des lymphocytes B dans le foie fœtal (Scott et al. 1994). Quant à Ikaros, son rôle majeur dans la différenciation lymphoïde a été mis en évidence principalement grâce aux modèles d'invalidation du gène chez la souris, dont la conséquence observée fut l'absence de cellules pro-B et pré-B dans la moelle osseuse, un blocage de la lymphopoïèse et une diminution des effecteurs de la recombinaison V(D)J (J. H. Wang et al. 1996; Kirstetter et al. 2002; Heizmann, Kastner, and Chan 2018).

D'autres facteurs de transcription ont été montrés comme étant nécessaires à la différenciation des cellules progénitrices en PLC. Parmi eux, Hoxa9 et Flt3, qui agissent en synergie. Par ailleurs, il été mis en évidence que l'inhibition d'un de ces 2 facteurs diminue de

manière drastique le nombre de PLC ainsi que l'ensemble des cellules B qui en découle (Gwin et al. 2013).

La différenciation des PLC en cellules pro-B requiert plusieurs régulateurs comme l'IL-7, E2A et EBF. En effet, l'interaction de l'IL-7, sécrété par les cellules stromales de la moelle osseuse, avec son récepteur IL-7Rα (ou CD127), présent à la surface des lymphocytes B, est indispensable à la survie, à la différentiation et à la prolifération des cellules B (Corfe and Paige 2012). L'IL-7 va également réguler l'activité de régulateurs de transcription tels que E2A et EBF (pour early B cell factor) essentiels à la maturation des PLC en cellules pro-B (Singh, Medina, and Pongubala 2005). Une étude a montré que E2A et EBF sont capables d'induire les réarrangements Vκ-Jκ et Vλ-Jλ, ainsi que le réarrangement DH-JH, dans une lignée de cellules non-B lorsqu'ils sont en présence des recombinases RAG-1 et RAG-2, suggérant ainsi que ces deux facteurs participent activement au réarrangement des Ig (Bain et al. 1994; Romanow et al. 2000). Il a également été démontré que le facteur de transcription C/EBPα est requis pour la maturation des PLC en cellule pre-pro-B (H. Guo et al. 2018).

Pour finir, un autre régulateur de la lymphopoïèse B a été mis en évidence, appelé Pax5. L'expression de Pax5 est observée du stade pro-B jusqu'au stade B mature mais est absente dans les cellules plasmatiques différenciées (Barberis et al. 1990). Son expression dans les cellules pro-B est notamment permise par les facteurs E2A et EBF et est essentielle au maintien des cellules pro-B dans leur voie de différenciation (Cobaleda et al. 2007). D'ailleurs, son invalidation chez la souris engendre un blocage de la lymphopoïèse B au stade pro-B (Nutt et al. 1997). Pax5 va également réprimer des gènes non spécifiques de la lignée B comme CD33 (exprimé à la surface des cellules myéloïdes) et activer les gènes spécifiques de la lignée lymphoïde comme CD79a, CD19 et CD21 (Cobaleda et al. 2007). Par ailleurs, son rôle dans le processus de recombinaison V(D)J a été montré dans différentes études. En effet, l'étude des associations VH-DH-JH chez des souris Pax5 -/-, a montré que ces souris présentent une diminution des réarrangements des segments VH-DJH de 50 fois comparées aux témoins (Nutt et al. 1997). Cependant, aucune altération dans les réarrangements DH-JH n'a été observée (Nutt et al. 1997). De plus, il a été montré que Pax5 pouvait induire le réarrangement des VH distaux en modifiant la conformation spatiale du locus IgH qui, en se contractant, rapproche les VH distaux des segments DH/JH réarrangés (Fuxa et al. 2004). Il a même été observé que Pax5 favorise la modification répressive H3K27me3 de l'histone 3 au niveau des VH proximaux pour permettre aux VH distaux d'être plus facilement réarrangés (C.-R. Xu et al. 2008).

D- Les sélections positive et négative des LB

D.1- Sélection positive via le pré-BCR

De la même manière que pour les LT, différents points de contrôle durant la lymphopoïèse B ont été décrits pour éviter la production de BCR non productifs ou autoréactifs. Le premier point de contrôle est effectué au stade pré-B, après formation du pré-BCR, dans le but d'éliminer les cellules B ayant réarrangés les segments de chaînes lourdes de façon non productive. Cette sélection est notamment permise par la transduction du signal passant par le complexe Igα/Igβ, qui engendre un blocage de la différentiation des cellules B au stade pré-B lorsqu'ils sont absents, sans affecter le réarrangement de la chaîne lourde (Pelanda et al. 2002). Un blocage au stade pré-B est également observé chez les souris présentant une mutation dans la partie constante de leur chaîne μ, montrant ainsi son importance pour la prolifération des cellules pré-B et le passage au stade B immature (Kitamura et al. 1991). La déficience en protéines λ5 et VpréB chez la souris diminue aussi fortement le nombre de cellules pré-B dans la moelle osseuse mais influence peu le développement final des cellules B qui sont présentes en nombre normal en périphérie et dont la réponse immunitaire est similaire à celle observée chez les souris contrôles (Shimizu et al. 2002). Cependant, chez l'Homme, la déficience de λ5 engendre une déficience sévère en cellules B dans le sang menant à une agammaglobulinémie (déficit en Ig dans le sang) (Minegishi et al. 1998). L'ensemble de ces résultats montre que les éléments constituant le pré-BCR sont indispensables pour la maturation des cellules pré-B. Le mécanisme qui conduit à la sélection positive des cellules B n'est pas totalement élucidé. Selon les travaux du groupe de Melchers, le signal de sélection serait « tonique », c'est-à-dire délivré indépendamment de la reconnaissance d'un quelconque ligand exogène par le pré-BCR et il dépendrait de la queue riche en arginine au niveau de la protéine λ5 (Ohnishi and Melchers 2003). D'autres groupes ont montré que ce signal de sélection pourrait être fourni par la reconnaissance d'un ligand exprimé par le stroma médullaire comme l'héparane sulfate (Bradl et al. 2003) ou la galactine-1 (uniquement chez l'Homme) (Gauthier et al. 2002). Même si les avis divergent concernant la reconnaissance ou non de ligands médullaires par le pré-BCR, les différentes découvertes s'accordent sur un point, l'importance de λ5 dans l'initialisation du signal de sélection positive. En effet, il a été montré que la mutation de la queue de λ5 altère principalement la

prolifération mais influe peu la survie et la différenciation des cellules pré-B (C. Vettermann et al. 2008). Il a ainsi été proposé que l'interaction de la queue de λ5 avec l'héparane sulfate présent dans le stroma médullaire permettrait d'amplifier les signaux de prolifération des cellules pré-B (C. Vettermann et al. 2008). Ainsi, une étude a montré que le traitement d'une lignée de cellules pré-B à l'héparane sulfate augmente indirectement l'action de l'IL7 ainsi que la phosphorylation de ERK, tous deux impliqués dans la prolifération des cellules B, montrant ainsi l'importance de l'interaction entre les cellules stromales et le pré-BCR (Milne, Corfe, and Paige 2008). Finalement, toute cellule incapable d'assembler son pré-BCR, ou d'associer et de transporter à la membrane une chaîne lourde μ sera éliminée par apoptose. Ainsi, 75% des cellules pré-B seront éliminées durant la lymphopoïèse B. Les cellules positivement sélectionnées vont, quant à elles, débuter le réarrangement de la chaîne légère du BCR et passer ainsi au stade B immature.

D.2- Sélection négative des cellules B immatures

Afin d'éliminer les BCR autoréactifs, les cellules B immatures vont subir une sélection négative similaire à celle trouvée chez les LT. Les récepteurs BCR nouvellement réarrangés vont interagir avec les Ag du soi présents dans l'environnement médullaire et ces interactions vont définir le devenir des cellules B immatures. Plusieurs processus sont impliqués dans la tolérance centrale dont la délétion clonale (ou mort par apoptose). La délétion clonale a été décrite dans les travaux menées par Nemazee et ses collaborateurs. Ils ont étudié les cellules B de souris transgéniques qui portent des Ig anti-H-2Kk (et H-2Kb) dirigés contre la molécule de CMH H-2Kk. Le résultat de cette étude a montré que les cellules B autoréactives portant les Ig anti-H-2Kk ont été éliminées des tissus immunitaires secondaires comme la rate et les ganglions lymphatiques et sont absentes dans le sang de ces souris, montrant ainsi que les cellules B autoréactives ont subi une apoptose (D. A. Nemazee and Bürki 1989). D'autres études ont montré que les cellules B autoréactives sont également sujettes à un autre évènement qui est l'anergie. Goodnow et ses collaborateurs ont réalisé une expérience qui a consisté à croiser des souris transgéniques exprimant le lysozyme de blanc d'œufs de poulet (HEL pour « Hen Egg-white Lysozyme ») avec des souris exprimant une Ig transgénique spécifique de HEL. Ils ont ainsi montré que leur progéniture sont capables de développer des cellules B matures portant des Ig anti HEL et pouvant migrer vers la périphérie mais qui sont

non fonctionnelles face à l'Ag HEL suggérant que ces cellules B sont entrées en phase d'anergie (Goodnow et al. 1988). Des études ultérieures ont montré que la délétion clonale et l'anergie ne sont pas les seuls modes de sélection contre les cellules B immatures autoréactives, il existe en effet un autre système, qui est l'édition du récepteur (ou « editing ») comme décrit précédemment pour les LT. Durant ce processus, les cellules B immatures autoréactives réactivent leur programme de réarrangement de la chaîne légère, entraînant l'expression d'une nouvelle chaîne légère associée à la chaîne lourde existante pour former un BCR non autoréactif (Tiegs, Russell, and Nemazee 1993). L'édition du récepteur serait le principal processus, lors de la sélection négative, mis en place pour pallier à l'autoréactivité des cellules B. En effet, il a été montré que l'environnement médullaire est plutôt protecteur pour les cellules B envers les signaux apoptotiques, ce qui n'est pas le cas pour l'environnement splénique (Sandel and Monroe 1999). De plus, il a également été constaté une augmentation de l'expression de RAG2 dans les cellules B immatures, ce qui converge avec la notion d'édition des Ig autoréactives plutôt qu'une délétion clonale (Sandel and Monroe 1999).

Les cellules B immatures réussissant à passer la sélection négative, vont recevoir un signal de survie *via* la voie de signalisation ERK/MAP et PI3K, conduisant à leur différentiation en cellules B matures suivi de leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires où elles subiront d'autres étapes de maturation (D. Nemazee 2017; Abdelrasoul et al. 2018). Dans ces organes, les cellules B matures naïves vont rencontrer pour la première fois un Ag exogène. Les cellules B matures qui reconnaissent l'Ag vont s'activer et deux processus supplémentaires de diversification du répertoire B vont intervenir, l'hypermutation somatique (introduction de mutations ponctuelles et aléatoires dans les domaines variables du BCR) et la commutation isotypique (modification de l'isotype de la chaîne lourde du BCR) (Z. Li 2004) qui permettent d'augmenter à la fois l'affinité du récepteur pour l'Ag et l'efficacité de la réponse immunitaire. Ces dernières étapes de maturation des LB vont conduire à la formation d'un pool de cellules B mémoires et de plasmocytes sécréteurs d'Ac (Shinnakasu and Kurosaki 2017).

2- IMPACTS DU STRESS SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

2.1- Le stress

2.1.1- Définition

Dans son ouvrage « Introduction à l'étude de la médecine expérimentale » en 1865, Claude BERNARD, médecin français, présente le concept d'équilibre du milieu intérieur (Bernard 1865). Il introduit la notion d'un équilibre physiologique dynamique interne, assuré par des mécanismes capables de maintenir des conditions internes constantes face à des conditions externes variables. Le physiologiste américain Walter Bradford Cannon reprendra ce concept d'équilibre intérieur de l'organisme et le nommera homéostasie (Cannon 1926). Par ailleurs, il décrit pour la première fois le principe de « fight-or-flight » ou « combat-fuite », correspondant à la réponse de l'organisme face à une menace (Cannon 1915). Selon Cannon, la réponse « combat-fuite » est le résultat d'une décharge du système nerveux autonome qui mène l'animal à fuir ou bien à combattre lorsqu'il est face à une menace. Cannon parviendra ensuite à prouver que la sécrétion d'adrénaline s'élève lorsque le système nerveux d'un animal est excité par une émotion violente. Il découvrira en 1931 la sympathine, une substance sécrétée au niveau des glandes médullosurrénales dans le circulation générale, appelée aujourd'hui la noradrénaline (R. S. Harris, Marrian, and Thimann 1957). En outre, les travaux de Cannon ont décrit l'importance du système nerveux central dans la prise en charge des stimuli et la régulation de l'homéostasie lorsque l'organisme est face à un danger potentiel. Les travaux de Cannon s'avèreront correspondre aux premières étapes de réponse au stress aussi appelé syndrome général d'adaptation, décrit par l'endocrinologue Hans Selye. Le concept de stress est introduit par Selye au début du XXème siècle. Il décrit le stress, comme étant « la réponse non spécifique de l'organisme à toute sollicitation», autrement dit, le stress est une réaction physiologique d'adaptation de l'organisme face à toutes perturbations déséquilibrant l'homéostasie interne (Selye 1956). Selye explique que la réponse au stress est généralisée et qu'elle s'effectue en trois stades différents. Le premier stade correspond à la **phase d'alarme** qui correspond à la réponse « combat-fuite » décrite par Cannon. La réponse est de courte durée et l'organisme va mobiliser ses ressources énergétiques rapidement. En effet, durant cette phase, la concentration plasmatique de glucose, de triglycérides et d'acides gras libres augmente considérablement dans les premières minutes qui suivent la survenue du stress, de même que le rythme cardiaque et la pression artérielle (Carlson, Levi, and Orö 1968; De Boer et al. 1990). La seconde étape est la **phase de résistance**, si le stress persiste l'organisme continue à puiser dans ses ressources afin de revenir à l'état d'équilibre

homéostatique. La troisième phase est la **phase d'épuisement**. Cette phase se produit lorsque le stimulus stressant se répète ou lorsqu'il devient trop long. L'organisme épuise alors considérablement ses ressources énergétiques et ne peut plus s'adapter efficacement à l'agent stressant. Cette phase entraine souvent la survenue d'un état pathologique comme la dépression (Godbout and Glaser 2006).

Dans ses études, Selye distingue deux types de stress, le stress positif ou « eustress », qui est sain et bénéfique à l'organisme, provoquant une sensation de bien-être et de satisfaction et le stress négatif ou « distress », qui se traduit par un sentiment de frustration et d'anxiété pouvant mener à un état dépressif et qui ne permettrait pas un retour à l'équilibre. Il est important de souligner que la perception du stress et la sévérité de son impact est individu dépendant (Selye 1975). Aujourd'hui, on décrit deux autres types de stress, le stress aigu et le stress chronique qui diffèrent, entre autres, par la durée d'exposition à l'agent stressant. En effet, le stress aigu correspond à un stress le plus souvent intense et limité dans le temps (quelques heures). Face au stress aigu, l'organisme agit rapidement en mobilisant les ressources énergétiques nécessaires pour répondre au mieux à l'agent stressant. Il a été montré que dans certains cas, le stress aigu pouvait améliorer les performances physiques et cognitives d'un individu lorsque celui-ci était contraint de faire face à un challenge. C'est la cas lors d'un passage d'examens scolaires ou d'une compétition sportive (Takemura, Kikuchi, and Inaba 1999; Corbett, Weinberg, and Duarte 2017). Cependant, lorsque le stress aigu est trop intense (comme une agression physique), il peut aboutir à un déséquilibre émotionnel et engendrer des troubles psychiatriques comme la dépression ou des troubles d'anxiétés généralisés (Cahill and Pontoski 2005). Le stress chronique, quant à lui, est associé à des effets délétères pour l'organisme. Il correspond à des agressions intenses ou modérées, mais répétées et prolongées dans le temps (plusieurs mois). Il épuise les ressources énergétiques de l'organisme favorisant ainsi la survenue de pathologies comme des maladies mentales (dépressions, déficiences cognitives), des maladies cardiovasculaires ou encore le cancer (Godbout and Glaser 2006).

2.1.2- Quelques chiffres

Compte tenu du fait que le stress est perçu différemment selon les individus, il est difficile d'évaluer de manière chiffrée ses conséquences sur l'organisme. Cependant, de nombreuses études ont été menées pour évaluer le stress au travail. Le stress toucherait 4 salariés sur 10 (Enquête ANACT/CSA, juin 2009). En Europe, le coût annuel du stress lié au travail est estimé à 20 milliards d'euros (source : Agence européenne pour la sécurité et la santé au travail – EU-OSHA, 2014). En France, ce chiffre (comprenant les frais médicaux, les dépenses liées à l'absentéisme, aux cessations d'activité et aux décès prématurés) a été estimé entre 1,9 et 3 milliards d'euros en 2007. Selon l'OMS (Organisation mondiale de la santé), la France serait le 3ème pays recensant le plus grand nombre de dépressions liées au travail. (Rapport du 12 mars 2008). Le stress est donc devenu un problème de santé publique majeur au sein de notre société. Les mécanismes d'action et de régulation du stress font donc l'objet de nombreuses études afin de limiter l'émergence de pathologies liées au stress.

2.2- Mécanismes physiologiques de la réponse au stress

2.2.1- Activation du système sympathique

Les facteurs de stress sont nombreux, mais il est possible de les classer dans deux grandes catégories, d'une part, les stress physico-chimiques comme par exemple les radiations (solaires ou autres), les changements de pression ou de température, le bruit, l'exposition à des agents toxiques etc… et d'autre part, les stress socio-environnementaux, qui sont plus difficiles à identifier mais qui regroupent toutes les perturbations susceptibles de modifier l'état émotionnel de l'individu comme le décès d'un proche, les problèmes familiaux ou encore les soucis d'argent, etc… . Les stress physico-chimiques sont détectés par des récepteurs spécifiques, tels que des récepteurs mécaniques ou thermosensibles, au niveau de la périphérie du corps, qui vont émettre des signaux somatosensoriels jusqu'au système nerveux central (SNC) par l'intermédiaire de fibres nerveuses sensitives (Chen and Lyga 2014). Les stress socio-environnementaux vont être perçus par les organes sensoriels et les innervations afférentes qui réceptionnent les informations avant de les transmettre au SNC (Herman et al. 2005). Dans le cerveau, il existe un circuit neuronal qui détermine ce qui est menaçant et donc stressant pour l'individu. Les acteurs de ce circuit comprennent l'hippocampe, l'amygdale et les zones du cortex préfrontal aussi appelés système limbique

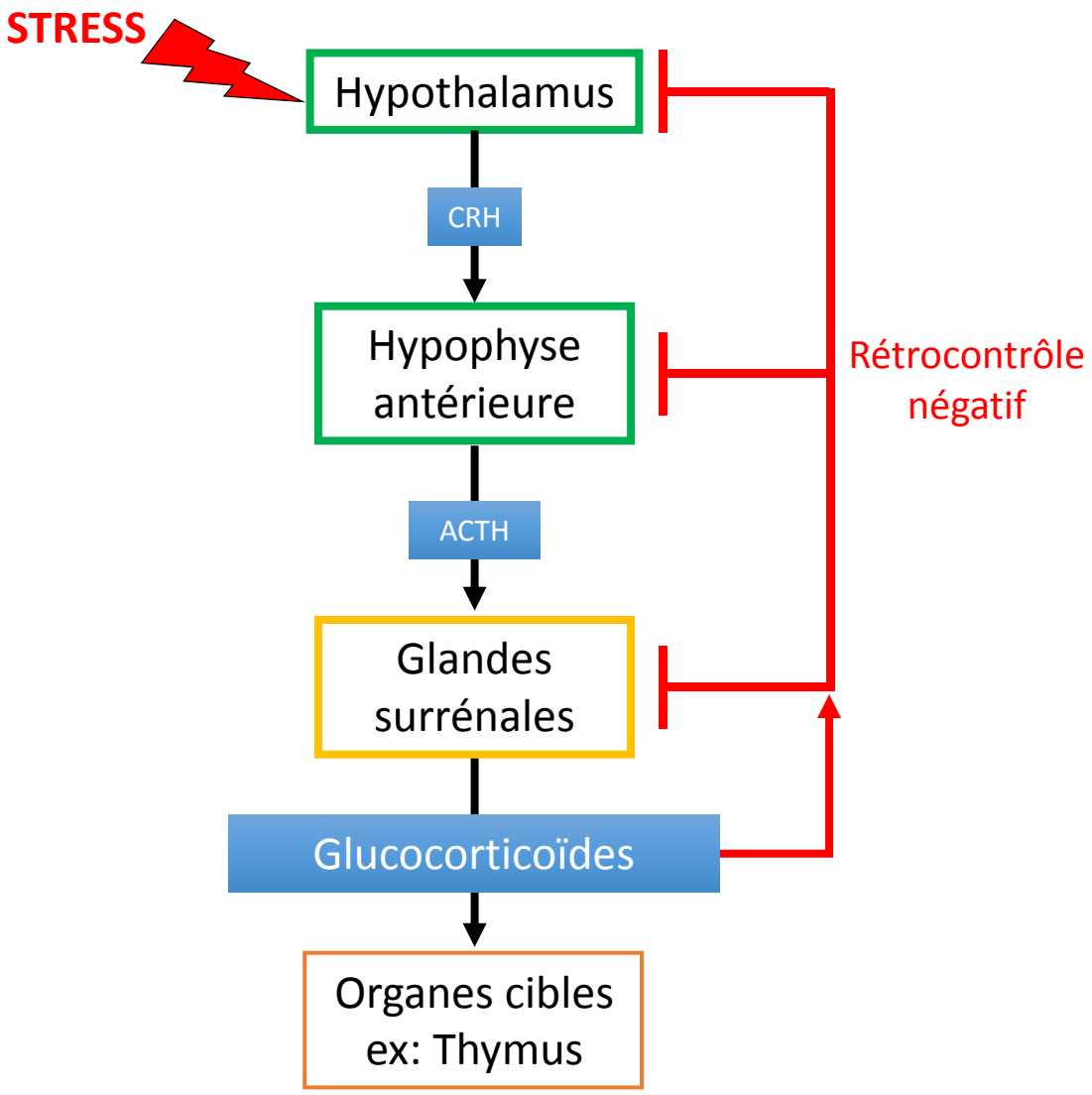


Figure 21: Schéma récapitulatif de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS).

L'activation de l'axe HHS engendre la libération de l'hormone CRH (Corticotropin Releasing Hormone ou corticolibérine) qui se fixe à son récepteur au niveau de l'hypophyse antérieur. Cette fixation induit la libération de l'hormone hypophysaire ACTH (Adrenocorticotropic hormone) qui va à son tour activer la sécrétion de glucocorticoïdes dans la circulation systémique par les glandes corticosurrénales. Ces derniers vont agir sur des organes cibles d'une part et sur le système nerveux central d'autre part pour modérer l'activation de l'axe HHS.

(Herman et al. 2005). Ensemble, ils régulent les processus de stress physiologiques et comportementaux qui peuvent être adaptatifs à court terme et inadaptés à long terme. Le système limbique réalise une analyse comparative entre le stress perçu et les expériences affectives passées afin d'élaborer une réponse adaptée qui sera permise par l'activité de l'hypothalamus, organe clé dans le déclenchement des réactions au stress (Herman et al. 2005). Une fois le stimulus intégré et perçu comme stressant, l'hypothalamus va alors activer le système nerveux sympathique en utilisant comme médiateurs préférentiels les catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine) (Palkovits 1981; Goldstein 1987). Ces dernières vont être responsables de l'augmentation du rythme cardiaque, de la pression artérielle, du transport de dioxygène et également de l'augmentation plasmatique du glucose et des acides gras libres permettant au sujet de réagir physiquement au danger (Wortsman 2002; Ranabir and Reetu 2011). Ce phénomène physiologique correspond au premier stade de réponse au stress, appelé **phase d'alarme**, qui a été décrite précédemment.

2.2.2- Activation de l'axe corticotrope ou HHS

2.2.2.1- Organisation fonctionnelle de l'axe corticotrope

La seconde phase, ou **phase de résistance**, implique l'activation d'un système hormonal appelé axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) (Figure 21). Sous l'effet du stress, l'hypothalamus est stimulé au niveau des neurones sécrétoires du noyau paraventriculaire. Ces derniers vont secréter deux neuropeptides, l'arginine vasopressine qui par son activité antidiurétique permet de réguler la sécrétion de catécholamines (Itoh et al. 2006) et la corticolibérine ou CRH (corticotropin-releasing hormone). La fixation de la CRH sur ses récepteurs spécifiques situés au niveau de l'hypophyse, entraine la sécrétion dans la circulation systémique de l'hormone hypophysaire, l'ACTH (Adrenocorticotropic hormone) qui est une hormone dérivant de la pro-opiomelanocortine (POMC). L'ACTH se fixe ensuite à son récepteur spécifique (MC2-R ou récepteurs aux mélanocortines) situé essentiellement au niveau des glandes corticosurrénales. Ces dernières sont des glandes endocrines qui constituent la couche externe des glandes surrénales situées au-dessus des reins et qui sont impliquées dans la sécrétion des stéroïdes dont les glucocorticoïdes. En se fixant sur son récepteur, l'ACTH va induire la synthèse et la libération des glucocorticoïdes dans la circulation

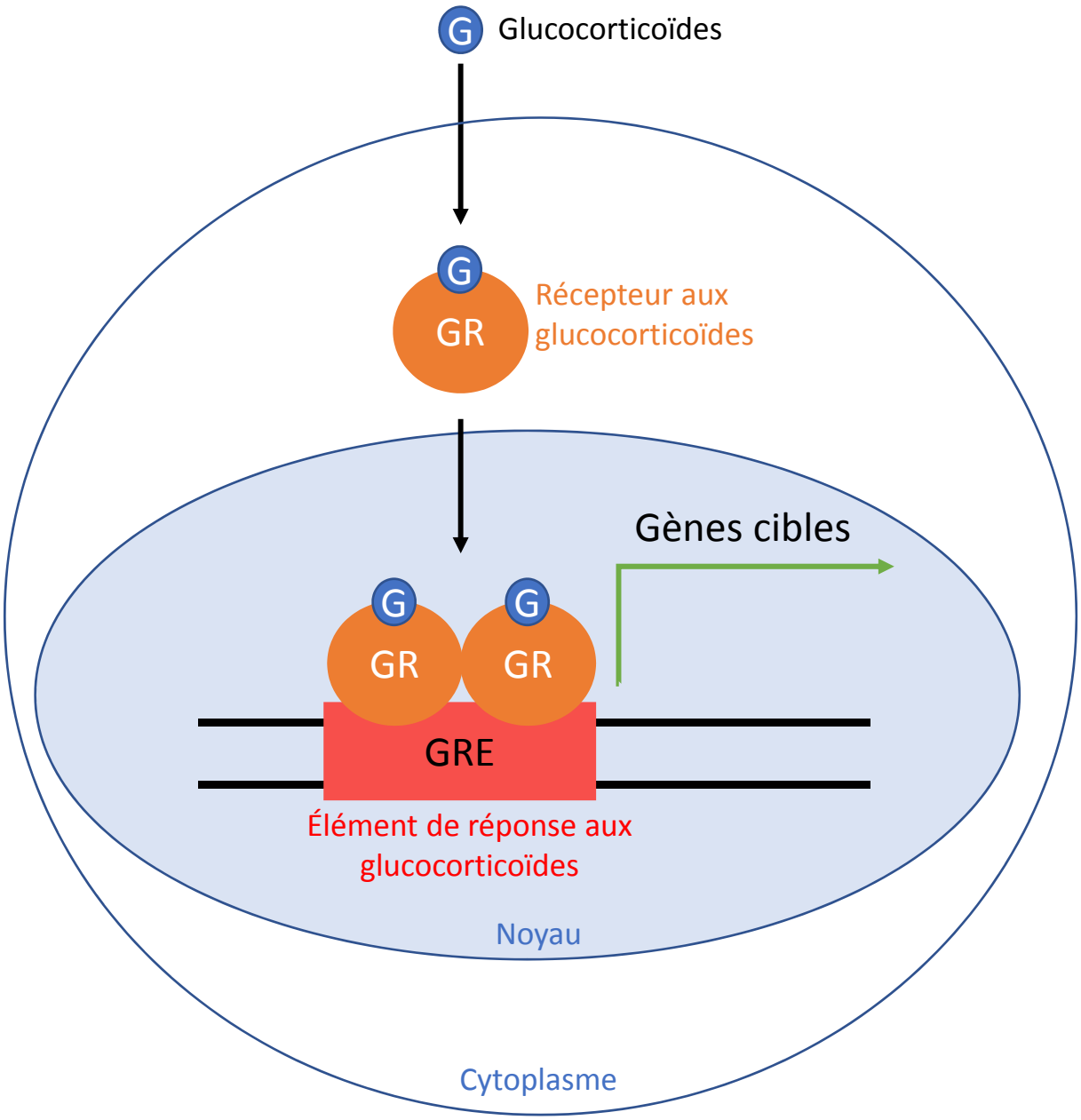


Figure 22: Mode d'action des récepteurs aux glucocorticoïdes

L'interaction des glucocorticoïdes sur leur récepteur dans le cytoplasme va induire la formation d'un dimère de récepteurs qui va transloquer dans le noyau. Ce dimère va ensuite se fixer sur l'ADN au niveau d'un promoteur GRE (glucocorticoid-response elements) et venir réguler l'expression des gènes cibles impliqués dans des fonctions très variées telles que l'inflammation, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la transduction de signal, etc….

sanguine. En fait, l'ACTH promeut l'étape initiale de la conversion du cholestérol en glucocorticoïdes comme la corticostérone chez le rongeur ou le cortisol chez l'Homme. Les glucocorticoïdes agissent sur les cellules cibles en se liant à deux types de récepteurs nucléaires : les récepteurs aux minéralocorticoides (MR) codés par le gène *nr3c2* et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) codés par le gène *nr3c1*. La fixation des glucocorticoïdes sur ces récepteurs va stimuler le catabolisme des lipides et des protéines, inhiber la sécrétion d'insuline et donc augmenter la production de glucose pour apporter l'énergie nécessaire à l'organisme pour répondre efficacement au stress (Macfarlane, Forbes, and Walker 2008).

2.2.2.2- Les récepteurs aux glucocorticoïdes

Les MR et les GR diffèrent par leur localisation tissulaire dans l'organisme et par leur affinité pour les glucocorticoïdes naturels. En effet, les glucocorticoïdes naturels se fixent aux MR avec une affinité 10 fois supérieur par rapport aux GR (De Kloet et al. 1998). Les glucocorticoïdes naturels ne se fixent sur les GR qu'après une sécrétion importante de glucocorticoïdes (pendant le pic du cycle circadien ou pendant un stress) (De Kloet et al. 1998; Finsterwald and Alberini 2014). Bien que les glucocorticoïdes aient une meilleure affinité pour les MR, la distribution des GR au sein de l'organisme est beaucoup plus importante. En effet, les MR se trouvent principalement au niveau du système limbique du cerveau (hippocampe, amygdale, régions restreintes du cortex) et de l'hypothalamus (Seckl et al. 1991; P. D. Patel et al. 2000) alors que les GR sont plus largement distribués dans le cerveau (Seckl et al. 1991; P. D. Patel et al. 2000) et sont également retrouvés au niveau de nombreux organes tels que les muscles squelettiques ou le foie (Lattin et al. 2012). De manière intéressante, les GR sont aussi présents au niveau des cellules du SI comme les LT, les LB et les neutrophiles (Miller et al. 1998; Gruver-Yates, Quinn, and Cidlowski 2014).

2.2.2.3- Mode d'action des GR

Les récepteurs GR sont en réalité des facteurs de transcription. L'interaction ligand-récepteur va induire la formation d'un dimère de récepteurs qui va transloquer dans le noyau (Figure 22). Ce dimère va ensuite se fixer sur l'ADN au niveau d'un promoteur GRE (glucocorticoid-response elements) et venir réguler l'expression des gènes cibles (Datson et al. 2008). Ce

complexe peut ainsi réguler de nombreux gènes impliqués dans des fonctions très variées tels que l'inflammation, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la transduction de signal, l'adhésion cellulaire, les structures neuronales, le métabolisme, etc… (J.-C. Wang et al. 2004; Datson et al. 2008).

2.2.2.4- Régulation de l'axe corticotrope

Comme il a été décrit précédemment, les glucocorticoïdes sont impliqués dans de nombreux processus biologiques permettant à l'organisme de maintenir son homéostasie. Cependant, à fortes concentrations et à long terme, les glucocorticoïdes deviennent néfastes et induisent un état de dépression (Pariante and Lightman 2008). De ce fait, leur production est très finement régulée. Pour éviter la surcharge de glucocorticoïdes dans l'organisme, il existe un rétrocontrôle négatif de l'axe HHS, dépendant des GR, au niveau de l'hypothalamus, de l'hypophyse, des glandes surrénales et de l'hippocampe (Figure 21). L'autorégulation de la sécrétion des glucocorticoïdes aboutit à la diminution de la sécrétion de CRH au niveau de l'hypothalamus, à l'inhibition de la sécrétion de l'ACTH par l'hypophyse et finalement à l'arrêt de la sécrétion des glucocorticoïdes par les glandes surrénales en maintenant ainsi les taux circulants de corticostérone dans les limites physiologiques. (S. M. Smith and Vale 2006).

D'autre part, il a été montré sur une lignée cellulaire (HeLa) exprimant les GR par transfection, qu'un traitement de 24h avec un glucocorticoïde synthétique (dexaméthasone) engendre une diminution de l'expression des ARN codant les GR ainsi qu'une diminution du taux de GR protéiques dans ces cellules (Burnstein et al. 1991). Une autre étude a montré que des rats ayant subi une perfusion de corticostérone directement dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, ne présentent pas d'augmentation d'expression de l'ACTH, ni d'augmentation de la CRH induite par un stress de contention, contrairement aux témoins qui voient leurs expressions d'ACTH et de CRH augmenter après avoir été stressés (Weiser, Osterlund, and Spencer 2011). Les glucocorticoïdes peuvent également agir directement sur les glandes surrénales en diminuant l'expression de gènes codant pour des enzymes impliqués dans la stéroïdogenèse et ainsi inhiber la production *de novo* de corticoïdes (Carsia and Malamed 1983; Arola et al. 1994).

Un autre mécanisme de régulation des glucocorticoïdes existe au niveau intracellulaire. Ce mécanisme fait intervenir deux enzymes, les 11 bêta hydroxystéroïde déshydrogénases de

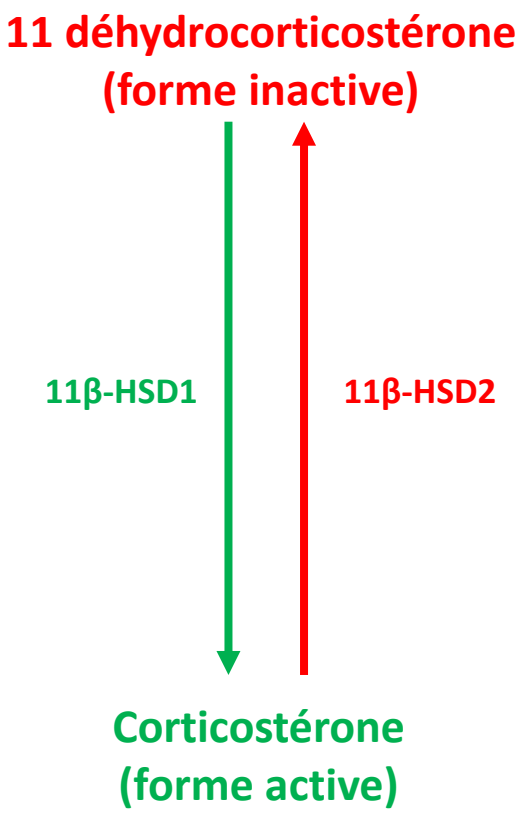


Figure 23: Rôle des 11β-HSD dans la régulation de l'activité de la corticostérone.

La 11βHSD1 catalyse la transformation de la 11-déhydrocorticostérone (forme inactive) en corticostérone (forme active). A l'inverse, la 11β-HSD2 va inactiver la corticostérone afin de donner de la 11-déhydrocorticostérone.

type 1 et de type 2 (11β-HSD1 et 11β-HSD2 respectivement) qui vont soit activer, soit inactiver les glucocorticoïdes circulants (Figure 23). En effet, 11β-HSD1 catalyse la forme active des glucocorticoïdes grâce à son activité réductase, c'est-à-dire qu'il va convertir la 11-déhydrocorticostérone (forme inactive chez le rongeur) et la cortisone (forme inactive chez l'Homme) en corticostérone (forme active chez le rongeur) et en cortisol (forme active chez l'Homme) (Chapman, Holmes, and Seckl 2013). 11β-HSD2 va catalyser, quant à lui, la forme inactive des glucocorticoïdes grâce à son activité déshydrogénase (Chapman, Holmes, and Seckl 2013). 11β-HSD1 est très largement exprimé dans l'organisme (cœur, muscles squelettiques, tissus adipeux, foie, cerveau, … etc) alors que l'expression de 11β-HSD2 est plus limitée (rein, pancréas, épithélium de la peau, poumon, côlon, …etc). L'expression généralisée de ces enzymes au sein de l'organisme permet de réguler localement l'action des glucocorticoïdes. Les souris déficientes en 11β-HSD1 présentent une hyperplasie des glandes surrénales ainsi qu'une réponse exagérée au stress de contrainte qui se traduit par une augmentation du taux plasmatique d'ACTH et de corticostérone (H. J. Harris et al. 2001). Ces résultats suggèrent que l'enzyme 11β-HSD1 permettrait d'augmenter la sensibilité de l'axe HHS à la rétroaction négative des glucocorticoïdes faisant de lui un régulateur important de l'exposition aux glucocorticoïdes. La 11β-HSD2 est fortement exprimée dans les tissus fœtaux, comme le cerveau et le placenta, ce qui lui confère un rôle de «barrière aux glucocorticoïdes» (Wyrwoll, Holmes, and Seckl 2011). En effet, la mutation du gène codant cette enzyme, durant le développement murin, altère la croissance des animaux (plus petits à la naissance), perturbe le développement cérébral (cervelet plus petit) et provoque un comportement plus anxieux lors de tests comportementaux (M. C. Holmes et al. 2006; Megan C. Holmes et al. 2006). Cette enzyme est donc neuroprotectrice lors du développement fœtal en régulant étroitement le transfert des glucocorticoïdes materno-fœtaux.

L'ensemble de ces mécanismes régulateurs est essentiel pour éviter une exposition trop importante aux glucocorticoïdes. Il arrive cependant que ces mécanismes soient affectés par le stress chronique, induisant un excès de glucocorticoïdes qui auront des effets délétères sur l'organisme.

2.3- Impacts du stress chronique sur l'organisme

Comme nous l'avons vu précédemment, l'impact du stress sur l'organisme dépend de l'intensité et de la durée d'exposition au stress mais également de l'âge et du sexe de l'individu.

2.3.1- Impacts du stress en fonction du sexe

Il est aujourd'hui bien connu que les femmes sont plus sensibles au stress que les hommes. En effet, la prévalence de la dépression est 1,7 fois plus élevée chez la femme que chez l'homme (Albert 2015). Cette différence face au stress chronique a également été observée chez les rongeurs (Paré et al. 1999; Bereshchenko, Bruscoli, and Riccardi 2018). De nombreuses études ont essayé d'élucider les mécanismes biologiques responsables de cette différence. Ainsi, il a été montré que les hormones sexuelles, telle que l'œstradiol, étaient étroitement liées au contrôle de l'axe HHS. En effet, l'injection de dexaméthasone (DX) chez des animaux ovariectomisés, diminue le taux de corticostérone et d'ACTH par rapport aux animaux non traités à la DX, traduisant l'activation du rétrocontrôle de l'axe HHS lors d'un stress. En revanche, chez ces mêmes animaux ovariectomisés, l'injection de la DX après un traitement avec un estradiol synthétique, augmente la taux de corticostérone plasmatique, suggérant que cette fois la boucle de rétrocontrôle négative de l'axe HHS n'est pas activée (Verma, Balhara, and Gupta 2011). Cette étude suggère donc que l'œstradiol diminue la sensibilité de l'axe HHS à la rétroaction, pouvant expliquer ainsi la raison pour laquelle les individus femelles sont plus sensibles au stress. De plus, il a été montré que les cellules du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus expriment des récepteurs aux œstrogènes (RE) capables d'activer ou d'inhiber (selon le type de RE) l'expression de la CRH, et ainsi de moduler le taux d'anxiété des individus (Handa, Mani, and Uht 2012).

Il est intéressant de noter que comme le stress, l'efficacité même du système immunitaire est dépendante du sexe des individus. En effet, 80% des maladies auto-immunes touchent les femmes, les hommes ont presque deux fois plus de risques de mourir d'un cancer malin et les anticorps induits par les vaccins contre la grippe sont toujours au moins deux fois plus abondants chez les femmes que chez les hommes (S. L. Klein and Flanagan 2016). Ces différences sont également liées aux hormones sexuelles. En effet, ces hormones peuvent potentialiser la réponse immunitaire notamment *via* les éléments de réponses aux androgènes et aux œstrogènes au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans l'immunité

inné mais aussi *via* les récepteurs aux œstrogènes présents à la surface des lymphocytes, macrophages et DC (S. L. Klein and Flanagan 2016; Bereshchenko, Bruscoli, and Riccardi 2018).

2.3.2- Impacts du stress en fonction de l'âge

Le stress est capable d'affecter l'organisme du stade embryonnaire jusqu'à la fin de la vie des individus. Les glucocorticoïdes sont primordiaux au bon développement fœtal des animaux et sont d'ailleurs présents dans tous les organes vitaux afin de participer à leur maturation (Kitraki, Kittas, and Stylianopoulou 1997). Mais à trop fortes concentrations, ces glucocorticoïdes peuvent devenir néfastes à la croissance fœtale. Il est actuellement connu que la corticostérone maternelle est capable de passer la barrière placentaire pour venir rejoindre la circulation sanguine du fœtus (Zarrow, Philpott, and Denenberg 1970), témoignant ainsi de l'existence de la transmission materno-fœtal du stress. Il a été démontré que des animaux nés de mères stressées durant leur gestation, présentent un taux plus élevé de corticostérone, ainsi qu'une augmentation des récepteurs aux glucocorticoïdes, tant d'un point de vue transcriptionnel que d'un point de vue protéique (Pascuan et al. 2014). De nombreuses études ont démontré que le stress subit durant la gestation peut affecter le développement embryonnaire et fœtale. Ainsi, Abrari et son équipe ont démontré que des rates soumises à une séquence de stress différents durant toute leur gestation, donnent naissance à une progéniture présentant des troubles du comportement et de la mémoire ainsi qu'une diminution du poids corporel (Modir et al. 2014). Le stade gestationnel est donc un stade très sensible au stress.

L'impact du stress à l'âge adulte est différent entre des individus jeunes et des individus âgées. En effet, il a été montré que l'exposition de souris âgées à un protocole de stress chronique engendre une altération de la mémoire, une diminution du poids corporel ainsi qu'une augmentation de l'activité locomotrice lors des tests comportementaux, traduisant un état d'anxiété avancé (Lotan et al. 2017). Les souris jeunes ne présentaient aucun de ces troubles. Ces résultats montrent qu'en vieillissant, la sensibilité au stress augmente et les conséquences sur l'organisme sont plus importantes.

Finalement, tout au long de la vie, le stress peut impacter de nombreux systèmes vitaux de manière plus ou moins importante. L'impact du stress sur le système immunitaire a d'ailleurs été souvent étudié. Le stress chronique est très souvent associé à une immunosuppression,

susceptible de favoriser la survenue de pathologies (Mizoguchi et al. 2001; Ronald Glaser and Kiecolt-Glaser 2005).

2.4- Impacts du stress chronique sur le système immunitaire

2.4.1- Communication bidirectionnelle entre le système immunitaire et le système nerveux central

Il est aujourd'hui admis qu'il existe une communication bidirectionnelle entre le système nerveux central et le système immunitaire. Tout d'abord, les organes lymphoïdes primaires et secondaires sont innervés par le système nerveux autonome qui va libérer, au niveau des terminaisons nerveuses, des neurotransmetteurs et des médiateurs neuroendocriniens (Felten 1993). Ces hormones et substances neurochimiques sont capables de moduler la réponse immunitaire grâce à des récepteurs qui leurs sont spécifiques, présents à la surface des cellules immunitaires (ThyagaRajan and Priyanka 2012). Un autre circuit dans cette communication bidirectionnelle implique des produits du système immunitaire, comme les cytokines (IL-1, TNF-α, IL-6,…) qui peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et modifier les activités neuronales dans le SNC notamment pendant la fièvre ou lors de maladies inflammatoires (Banks, Kastin, and Broadwell 1995; Luheshi and Rothwell 1996; Isomäki and Punnonen 1997). Ainsi, la communication bidirectionnelle entre ces deux systèmes indique qu'il existe un lien très étroit entre le stress et la santé des individus.

Le stress est globalement reconnu pour avoir un effet immunosuppresseur sur l'organisme. Or, il est important de souligner que le stress aigu est capable d'améliorer l'efficacité du système immunitaire. En effet, plusieurs études ont montré que le stress aigu augmente le nombre de macrophages et de DC au niveau du site de l'infection ainsi que le nombre de lymphocytes T et B de manière à renforcer l'immunité innée et adaptative (F. S. Dhabhar and McEwen 1996; Saint-Mezard et al. 2003; Viswanathan, Daugherty, and Dhabhar 2005). L'implication du stress aigu dans la formation de lymphocytes T mémoire ainsi que dans l'amélioration de la réponse immunitaire lors de la réexposition à l'antigène a été également observée (F. S. Dhabhar and McEwen 1996; Firdaus S. Dhabhar and Viswanathan 2005). En revanche, les stress chroniques sont eux associés à l'inhibition du système immunitaire.

2.4.2- Effets du stress chronique sur le système immunitaire inné

L'ensemble des études consistant à élucider les effets du stress sur le SI a permis de montrer que le stress induit une redistribution des cellules immunitaires au niveau des différents tissus (Firdaus S. Dhabhar et al. 2012). En effet, un stress aigu engendre, dans un premier temps, une mobilisation des cellules immunitaires (comme les neutrophiles, les monocytes ou les lymphocytes) au niveau sanguin. Dans un deuxième temps, le nombre de ces cellules diminue dans le compartiment sanguin et augmente dans les organes périphériques, ce qui traduit un trafic de ces cellules du sang vers les OLS ou les sites infectés (Firdaus S. Dhabhar et al. 2012). Cependant, l'exposition au stress à long terme engendre la diminution générale du nombre de cellules immunitaires circulantes ainsi que la perte de la redistribution des cellules entre les différents tissus (F. S. Dhabhar and McEwen 1997). Ceci serait lié à l'expression de la molécule d'adhésion CD62 à la surface des cellules immunitaires qui a été montrée comme étant diminuée chez des vaches injectées avec du dexaméthasone (Weber et al. 2001).

Le stress chronique psychologique affecte également fortement la capacité phagocytaire des neutrophiles entraînant une diminution de l'activité bactéricide de ces derniers (Tsukamoto and Machida 2014). De plus, le stress chronique diminue la survie des macrophages, leur capacité phagocytaire ainsi que leur capacité à présenter les antigènes aux LT en diminuant l'expression des molécules du CMH-II (Sesti-Costa et al. 2012; Nakatani, Amano, and Takeda 2013). D'autres cellules du système immunitaire inné sont également impactées par le stress chronique. En effet, il a été montré que l'injection répétée de corticostérone durant plusieurs jours à des rats, engendre la diminution de la cytotoxicité des cellules NK (Rosenne et al. 2014). Les glucocorticoïdes régulent également à la baisse les molécules impliquées dans la présentation antigénique des DC, leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires et bloquent la maturation finale des DC suggérant que les glucocorticoïdes altèrent la fonction mais également la maturation des DC (Piemonti et al. 1999; Vétillard and Schlecht-Louf 2018). Les glucocorticoïdes sont surtout connus pour leur pouvoir anti-inflammatoire. En effet, ils suppriment la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF-α par les macrophages et les DC (Fantuzzi and Ghezzi 1993; Piemonti et al. 1999; Sesti-Costa et al. 2012) et augmentent l'expression de protéines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et la lipocortin-1 (Barnes 1998). Cependant, il a été constaté dans des cas de stress chroniques, comme chez des sujets dépressifs, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires,

suggérant que les glucocorticoïdes n'ont pas exclusivement un effet anti-inflammatoire (Fitzgerald et al. 2005).

2.4.3- Effets du stress sur le système immunitaire adaptatif

Les glucocorticoïdes libérés lors de stress chroniques impactent négativement les effecteurs de l'immunité adaptative. En effet, la prolifération et la migration des lymphocytes s'avèrent être affectées par l'augmentation des glucocorticoïdes après un stress (Verburg-Van Kemenade et al. 1999; Firdaus S. Dhabhar 2009; Flint et al. 2011). De manière intéressante, Rinner et al. ont montré qu'un stress court (1 min de manipulation) induit une augmentation de la prolifération des cellules T et B circulantes lorsque ces dernières sont cultivées avec des mitogènes tandis qu'un stress plus long (immobilisation de 2h) induit une diminution des mêmes réponses proliératives (Rinner et al. 1992). Le nombre de cellules T et B mémoires est également diminué par le stress chronique, ce qui va fortement altérer la réponse immunitaire lors des vaccinations (Burns et al. 2003; Y. Wang et al. 2016; Maydych et al. 2017).
Cependant, face à un même stress chronique, les LT et les LB sont différemment impactés. En effet, il a été observé que les cellules T murines diminuent fortement après un stress de type immobilisation alors que peu de modifications des cellules B sont constatées, suggérant ainsi que les LT et les LB ont une sensibilité différente face au stress (Domínguez-Gerpe and Rey-Méndez 2001).

2.4.3.1- Effets du stress sur les lymphocytes T

De nombreuses études ont montré que les LT sont sensibles au stress. Une étude menée sur des rats soumis à un stress répété, de type choc électrique pendant 7 ou 14 jours, a montré que leur masse corporelle ainsi que la masse de leur rate sont fortement diminuées par le stress (Batuman et al. 1990). Cette même expérience a permis de mettre en évidence une diminution du nombre total de cellules mononucléées, en particulier des cellules T cytotoxiques, dans la rate et le sang ainsi qu'une diminution de leur capacité proliférative après stimulation mitogénique (Batuman et al. 1990). Il a également été constaté que les troubles psychologiques chez l'Homme, comme la dépression, peuvent induire une diminution du nombre de lymphocytes T et B et altérer la prolifération lymphocytaire

(Schleifer et al. 1983, 1984). Des résultats similaires ont été observés dans une autre étude menée sur des souris qui ont été contraintes à rester dans un tube pendant 14h en étant privées de nourriture (Tarcic et al., 1998). Dans cette expérience, les souris stressées (et sans nourriture) présentent une diminution de la masse thymique due à la diminution du nombre de lymphocytes T (plus particulièrement des cellules DP) liée à une augmentation de leur apoptose (Tarcic et al., 1998). De manière intéressante, l'étude par cytométrie en flux de cellules CD4+ provenant de patients déprimés a révélé une augmentation importante de leur apoptose ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur de Fas (récepteur qui participe à la signalisation apoptotique par Fas-ligand) (Szuster-Ciesielska et al. 2008).

L'exposition à des stress chroniques moins sévères est également délétère pour les LT. En effet, l'exposition des rats à différents stress très légers (comme l'inversion jour/nuit pendant 24h) durant 3 semaines, induit une diminution du nombre de LT CD4+, CD8+ et DP (Guan et al. 2014) ainsi qu'une diminution de l'interleukine IL-2 plasmatique sécrétée par les LT, dont le rôle est d'activer la réponse immunitaire spécifique *via* la prolifération des lymphocytes, ce qui pourrait expliquer la perte de réponse vis-à-vis des agents mitogènes observée dans d'autres expériences (Batuman et al. 1990; Guan et al. 2014). De plus, il a été montré que la charge virale est fortement augmentée chez des souris exposées à un stress socio-environnemental avant une infection virale et que cette augmentation de charge virale est associée à une diminution de l'expression des gènes codant les marqueurs CD4 et CD8 et à une diminution de la réponse des lymphocytes T (Young et al. 2013).

Par ailleurs, une étude a montré que la production physiologique diurne de glucocorticoïdes chez les souris induit l'expression de l'IL-7R dans les cellules T ce qui contribue à la survie des cellules T et à leur redistribution entre les ganglions lymphatiques, la rate et le sang en contrôlant l'expression du récepteur de la chimiokine CXCR4 (Shimba et al. 2018). L'accumulation de cellules T dans la rate la nuit renforce la réponse immunitaire face à des agents pathogènes.

2.4.3.2- Effets du stress sur les lymphocytes B

Comme pour les LT, le stress peut altérer de manière importante la fonction et l'efficacité des LB. Par exemple, chez des souris dans lesquelles des implants ont été placés afin d'élever le

taux de glucocorticoïde sanguin à des niveaux analogues à ceux induits par des stress ou des traumatismes, il a été observé une réduction de 50% des lymphocytes B périphériques qui s'explique par l'apoptose des progéniteurs B (Garvy and Fraker 1991; Garvy et al. 1993). Il a par ailleurs été démontré dans une étude menée chez des étudiants, qu'un stress psychologique chronique, mise en évidence par une augmentation du taux de cortisol salivaire, induit également une diminution des lymphocytes B circulants (McGregor et al. 2016). De plus, l'augmentation du taux de corticostérone est associée à une diminution de l'expression des molécules du CMH-II sur les LB qui sont indispensables à l'interaction entre cellules B et cellules T, ce qui suggère que l'activation des LB par les LT est affectée par le stress (Weiss, Collier, and Pruett 1996). La sécrétion d'Ig se voit également affectée lors de stress chroniques. En effet, un étude menée sur des rats ayant subi quotidiennement un stress physique de contention de 6h pendant 15 jours, a révélé que les concentrations sériques d'IgA, IgE, IgG et IgM sont fortement diminuées (Moazzam, Hussain, and Ahmad 2013). Des résultats opposés ont été constatés chez des étudiants ayant un niveau de stress élevé pendant un examen académique (Maes et al. 1997).

Il a par ailleurs été montré que le stress chronique altère la réponse aux vaccins. En effet, une étude a montré que le stress psychologique, comme le fait de s'occuper d'un proche souffrant, induit une diminution de la réponse immunitaire au vaccin anti-pneumonie à pneumocoque ; moins d'anticorps IgG sont produits (R. Glaser et al. 2000). Une autre étude a montré que le taux d'Ac induit par un vaccin contre l'hépatite B, est diminué chez des sujets qui présentent un niveau élevé de stress, montrant que le stress psychologique influence négativement la réponse immunitaire humorale (Jabaaij et al. 1993).

2.4.4- Effets du stress sur le système immunitaire fœtal

Il est intéressant de noter que le stress chronique impacte également le système immunitaire durant le développement fœtal. En effet, des travaux ont mis en évidence une diminution de la quantité de lymphocytes circulants (principalement les lymphocytes T), une altération de la capacité proliférative des lymphocytes (Götz, Wittlinger, and Stefanski 2007) et une augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires (Diz-Chaves et al. 2013) chez des rongeurs nés de mères stressées. Chez l'Homme, il a été observé que des enfants nés de mères anxieuses ou dépressives sont plus susceptibles d'être malades durant leur première année

de vie, suggérant ainsi que leur système immunitaire serait moins efficace face aux pathogènes comparés à celui d'enfants nés de mères moins stressées (Beijers et al. 2010).

3- EFFETS DES VOLS SPATIAUX SUR LE CORPS HUMAIN

Depuis de nombreuses années l'Homme s'est lancé dans la conquête de l'espace. L'espoir de pouvoir un jour aller sur d'autres planètes est, aujourd'hui encore, au cœur de l'actualité. Cependant, les missions actuelles et même futures reposent sur des temps de vols longs (environ 6 mois pour les astronautes à bord de la station spatiale internationale (ISS) et environ 18 mois pour un aller-retour vers Mars). Or, les effets des vols spatiaux sur un organisme humain restent aujourd'hui incomplètement connus. Il est donc indispensable d'approfondir nos connaissances sur les effets des vols spatiaux de longues durées sur le corps humain.

3.1- Stress subits lors des vols spatiaux

Lors des vols spatiaux, les astronautes sont soumis à de nombreux stress différents de type physiques, psychologiques et socio-environnementaux.

Parmi les facteurs de stress physiques rencontrés par les astronautes durant un vol se trouvent :

- les températures extrêmes. En effet, lors de l'entrée dans l'atmosphère, le vaisseau spatial est soumis à des forces de frottement avec l'air qui peuvent élever la température à 2000°C autour du vaisseau, qui est protégé par un bouclier thermique. Malgré ce dispositif de protection, la température de l'habitacle augmente brutalement. De plus, à l'extérieur de la station spatiale internationale (ISS), les variations thermiques sont extrêmes, variant de -100 à 100 °C ce qui contraint les astronautes à porter des scaphandres pressurisés lors des sorties dans l'espace (ainsi que pendant l'atterrissage et le décollage) pour éviter au maximum les risques de brûlure (Thirsk et al. 2009). Par ailleurs, il a été montré qu'à bord de l'ISS, les astronautes présentent une augmentation d'un degré de leur température centrale corporelle au repos pouvant aller jusqu'à 40°C lors d'effort physique (température proche de la fièvre en condition physiologique) (Stahn et al. 2017). Cette augmentation de température corporelle est notamment liée à la diminution de la gravité

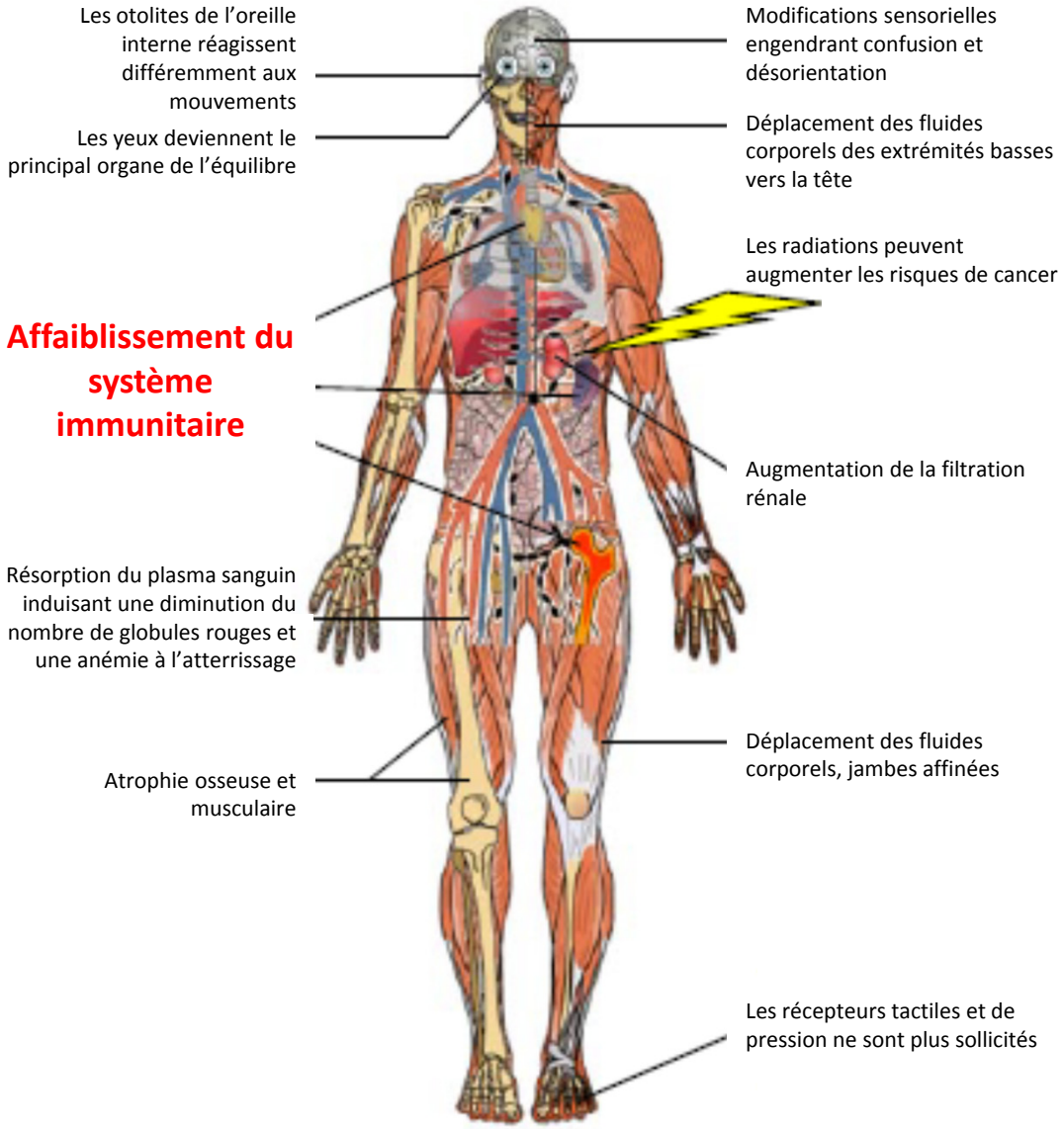


Figure 24: Effets des vols spatiaux sur l'organisme

Lors des vols spatiaux, les astronautes sont soumis à de nombreux stress différents de type physiques, psychologiques et socio-environnementaux. Ces stress altèrent l'ensemble des fonctions physiologiques. Cette représentation schématique du corps humain présente les principaux effets délétères liés aux conditions spatiales. (d'après Guéguinou et al. 2009)

qui entrave le transfert de chaleur par convection et diminue l'efficacité de l'évaporation. Le stress thermique est donc devenu un problème critique pendant l'exercice physique en apesanteur.

- les rayonnements ionisants chargés en particules de haute énergie. Les astronautes sont en effet exposés au rayonnement spatial provenant de sources solaires et cosmiques qui émettent des rayons gamma, des rayons X et des UV.
- le bruit ambiant à bord de l'ISS. Les différents composants du vaisseau spatial comme les ventilateurs, les pompes et les moteurs, génèrent un bruit continu proche de 60 dB susceptible d'altérer le sommeil et la concentration des astronautes (Thirsk et al. 2009).
- le changement de gravité. Au cours d'un vol habité, les astronautes sont exposés à des forces gravitationnelles. Au moment du décollage et de l'atterrissage, les astronautes sont soumis à une hypergravité alors qu'à bord de l'ISS, ils sont en micropesanteur (diminution chronique de la gravité lors de leur séjour spatial).

En plus des stress physiques, les astronautes sont soumis à des stress psychologiques et socio-environnementaux. Parmi ceux-ci se trouvent :

- l'alternance jour/nuit. L'ISS faisant le tour de la Terre en une heure et demie, le jour alterne avec la nuit toutes les quarante-cinq minutes, ce qui a pour conséquence de perturber le rythme circadien des astronautes (J.-H. Guo et al. 2014).
- le confinement et l'isolement social. Les astronautes sont forcés de vivre en petit comité, dans un espace clôt, avec d'autres astronautes de nationalités différentes et doivent s'adapter à l'éloignement de leurs proches (Pagel and Choukèr 2016). La peur permanente d'être confronté à une issue fatale lors de leur mission est également un élément psychologiquement stressant.

3.2- Effets des vols spatiaux sur l'organisme

Les stress subis par les astronautes lors de vols spatiaux altèrent l'ensemble des systèmes physiologiques de l'organisme (Guéguinou et al. 2009) (Figure 24). Un des premiers effets résultant des modifications gravitationnelles est la redistribution des fluides corporelles. En effet, pendant le vol spatial, les fluides corporelles se déplacent vers la tête engendrant une diminution d'environ 10% du volume dans les membres inférieurs et donnant un aspect

« bouffi » au visage (Williams et al. 2009). Les gradients de pression artérielle associés à une posture verticale sur la Terre sont modifiés en apesanteur (Hargens and Watenpaugh 1996). Ainsi, l'exposition à l'apesanteur réduit la pression artérielle moyenne au niveau des pieds et l'augmente au niveau de la tête. Par conséquent, les vaisseaux sanguins situés dans la partie inférieure du corps sont exposés de façon chronique à une pression artérielle inférieure à la normale, alors que ceux situés entre le cœur et la tête sont exposés à une pression artérielle plus forte. De plus, le déplacement des fluides vers la tête affecte les barorécepteurs du système vasculaire central, ce qui déclenche la suppression du système rénine-angiotensine-aldostérone, entraînant une augmentation de l'excrétion rénale de sel et d'eau et une réduction nette du volume plasmatique (Güell 1995). La réduction du volume plasmatique entraîne une augmentation transitoire des taux d'hématocrite. Cela semble provoquer une diminution de la sécrétion de l'érythropoïétine, conduisant à une diminution des globules rouges, ce qui engendre une anémie lors du retour sur Terre et une réduction globale d'environ 10% du volume sanguin total (Williams et al. 2009).

Les changements gravitationnels affectent également le système vestibulaire des astronautes qui vont éprouver le « mal de l'espace », semblable au mal des transports sur Terre. Ce mal de l'espace est dû à la perte des signaux liés à la gravité au niveau des otolites de l'oreille interne qui se traduit par la pâleur du visage, des vomissements, de la fatigue, la perte d'appétit et une désorientation (Heer and Paloski 2006). De plus, le risque de déficience visuelle et d'hypertension intracrânienne augmentent considérablement durant des missions longues (Nelson, Mulugeta, and Myers 2014).

La micropesanteur associée aux bruits constants engendrés par le fonctionnement de l'ISS, l'alternance jour/nuit modifiée et les horaires de travail pendant les missions spatiales perturbent le sommeil et impactent le rythme circadien, compromettant ainsi l'humeur, la cognition et la performance des astronautes en orbite. En effet, les stress physiques et psychologiques rencontrés lors des missions spatiales influencent l'activation de l'axe HHS induisant des niveaux élevés de cortisol pendant et après un vol spatial (Stowe, Sams, and Pierson 2011; Benjamin et al. 2016).

La micropesanteur induit également une atrophie musculaire et une déminéralisation osseuse. Après une mission de six mois, un astronaute peut perdre plus de 30% du volume

musculaire au niveau des muscles posturaux (comme l'extenseur du genou) et 12% de la masse des os porteurs (comme les vertèbres, le bassin) (Williams et al. 2009).

Il est également important de noter que l'exposition aux radiations augmente le risque de mutations génétiques et de cancer chez les astronautes (Chancellor, Scott, and Sutton 2014). Fait intéressant, l'impact des stress rencontrés lors de vols spatiaux sur les muscles, le squelette, les artères, les organes des sens, le système nerveux et le système immunitaire sont comparables à ceux observés chez des personnes âgées, montrant ainsi l'intérêt d'approfondir nos connaissances sur les effets de ces vols spatiaux sur l'organisme (Suedfeld et al. 2016).

3.3- Effets des vols spatiaux sur le système immunitaire

L'ensemble des stress rencontrés lors des vols spatiaux va également impacter le système immunitaire. De manière générale, les astronautes ont tendance à être immunodéprimés durant une mission spatiale. Cependant, les effets observés après un séjour en microgravité varient considérablement d'une étude à l'autre à cause des durées variables des missions et de la variabilité interindividuelle.

Au cours des vols, les astronautes sont contraints de vivre dans un milieu confiné où l'air est recyclé. Le risque d'exposition aux pathogènes ainsi que le risque de transmission entre individus est donc plus élevé, d'autant plus qu'en apesanteur certains microorganismes deviennent plus résistants aux antibiotiques (P. W. Taylor 2015). Il a d'ailleurs été observé que la réactivation de virus latents comme le virus de l'herpès (Epstein-Barr), de la varicelle ou du cytomégalovirus est présente chez plus de 80% des astronautes durant un vol spatial de courte durée (10-16 jours) (S. K. Mehta et al. 2014). La réactivation de ces mêmes virus a été constatée chez plus de 95% des astronautes à bord de l'ISS durant un vol long (60-180 jours) avec une excrétion virale (nombre de copies virales) plus importante comparée aux vols courts (Satish K. Mehta et al. 2017). Les vols spatiaux peuvent également augmenter la dangerosité des microorganismes en augmentant leur virulence. En effet, il a été montré qu'une souche de *Salmonella* cultivée dans un bioréacteur mimant l'apesanteur est beaucoup plus virulente une fois inoculée à des souris et présente une résistance plus forte à la destruction par les macrophages comparée à la même souche non soumise à l'apesanteur (Nickerson et al. 2000). Des résultats similaires ont été observés dans une étude menée sur des souris infectées par *Salmonella typhimurium* qui a été cultivée dans l'espace lors du vol STS-115. Cette étude a

montré que les souris infectées par les bactéries cultivées dans l'espace présente un taux de mortalité plus grand par rapport à celles infectées par la souche témoins cultivée au sol (J. W. Wilson et al. 2007; James W. Wilson et al. 2008). De plus, l'analyse des bactéries *S. typhimurium* et *Pseudomonas aeruginosa* soumises à des vols spatiaux a montré des différences dans l'expression de nombreux gènes ainsi que le rôle de la protéine régulatrice Hfq dans l'augmentation de leur virulence (J. W. Wilson et al. 2007; Crabbé et al. 2011). Afin d'éviter le risque de mettre en danger la santé des astronautes lors de vols spatiaux qui deviennent de plus en plus long, il est donc nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les altérations du système immunitaire en condition de vol. De nombreuses études se sont déjà penchées sur la question au cours de ces dernières années.

3.3.1- Effets des vols spatiaux sur le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné est fortement impacté par les vols spatiaux. L'étude des cellules NK d'astronautes ayant effectué un vol long à bord de l'ISS (128-195 jours) a montré que leur pouvoir cytotoxique et leur nombre de cellules NK est diminué après le vol (Rykova et al. 2008). De plus, une autre étude a démontré que des cellules NK humaines, cultivées dans des conditions de microgravité simulée pendant au moins 48, présentent une cytotoxicité diminuée associée à une augmentation de l'apoptose ainsi qu'une diminution de l'expression de l'interféron-γ (IFN-γ) et de la perforine (Q. Li et al. 2013). Il a également été montré, qu'à partir de 9-11 jours de vol, les neutrophiles circulant des astronautes sont fortement augmentés en nombre mais présentent une diminution de leur capacité à phagocyter des bactéries (Kaur et al. 2004). La capacité phagocytaire des monocytes chez les astronautes est également fortement réduite après 5 jours de vol (Kaur et al. 2005). De plus, il a été montré que l'expression de cytokines plasmatiques, jouant un rôle de médiateur et de régulateur dans de nombreux processus biologiques dont le SI, est perturbée par les vols spatiaux. En effet, l'analyse de la concentration plasmatique de différentes cytokines chez 28 astronautes ayant effectué un vol long à bord de l'ISS a montré une augmentation de quelques cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF-α et l'IL-6, ainsi qu'une augmentation des certains facteurs de croissance comme VEGF (vascular endothelial growth factor), impliqué dans l'angiogenèse, et de différentes chimiokines dont l'IL-8 qui est impliquée dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles sur le site de l'infection (Brian E. Crucian et al. 2014). Ces résultats

suggèrent donc que les vols spatiaux de longues durées perturbent la régulation du système immunitaire. De plus, l'apesanteur induit des modifications du cytosquelette des leucocytes ce qui va engendrer des altérations de la prolifération, de la transduction de signal, de l'activation lymphocytaire ainsi que de l'adhésion cellulaire contribuant ainsi à la diminution de l'efficacité de la réponse immunitaire (Grove, Pishak, and Mastro 1995; Pippia et al. 2011; Paulsen et al. 2014; Littleton and Ludwick 2015).

3.3.2- Effets des vols spatiaux sur le système immunitaire adaptatif

Les organes lymphoïdes primaires et secondaires ainsi que les cellules qui y résident sont fortement impactés par les vols spatiaux. Il a par exemple été montré chez des souris ayant volés 13 jours, une diminution de la masse splénique et thymique associée à une diminution du nombre de leucocytes et une diminution de la capacité proliférative des cellules B en réponse à un mitogène (Baqai et al. 2009). Les lymphocytes T et B sont donc fortement impactés par les conditions rencontrées lors de vols spatiaux, les principaux effets sont détaillés dans les parties suivantes.

3.3.2.1- Effets sur les lymphocytes T

Des altérations majeures ont été constatées au niveau du nombre et de la fonction des différentes populations lymphocytaires T. De manière générale, le nombre de lymphocytes T CD4+ et CD8+ diminue en condition spatiales. Cette diminution est associée à une augmentation de l'apoptose des cellules T (Lewis et al. 1998; Cubano and Lewis 2000). Une étude menée sur 16 astronautes, ayant effectués des vols longs à bord de l'ISS, a montré une diminution de 45 % de la thymopoïèse associée à une augmentation du niveau de cortisol plasmatique et urinaire après l'atterrissage (Benjamin et al. 2016). En plus de leur capacité proliférative altérée, l'activation des lymphocytes T en réponse à des mitogènes est fortement inhibée en condition de vol ou de micropesanteur simulée (Cogoli and Tschopp 1985; D. Cooper and Pellis 1998). Des études indiquent que cette défaillance d'activation serait en partie due à la diminution de la sécrétion de cytokines activatrices des lymphocytes T comme l'IL-2 et l'IFN-γ associée à la diminution de l'expression génique de l'IL-2 et de son récepteur en condition de vol et de micropesanteur simulée (Walther et al. 1998; B. E. Crucian, Cubbage,

and Sams 2000; Brian E. Crucian et al. 2008; Stowe, Sams, and Pierson 2011). De plus, différentes études ont analysé la sécrétion de cytokines liées à la sous-population Th1, comme l'IFN-γ, et de celles liées à la sous-population Th2 comme l'IL-10. De manière générale, ces études ont montré une diminution du ratio l'IFN-γ/IL-10 qui sous-entend une augmentation de la population Th2 (Brian E. Crucian et al. 2008; B. V. Morukov et al. 2010; B. Morukov et al. 2011; Stowe, Sams, and Pierson 2011; Guéguinou et al. 2012). Or, cette population est impliquée dans la survenue de certaines maladies auto-immunes systémiques ainsi que dans des réactions allergiques respiratoires et cutanées (Romagnani 1991; Deo et al. 2010) qui ont par ailleurs été observées chez certains astronautes après un vol de longue durée (B. Crucian et al. 2016).

De plus, il a été montré que la micropesanteur et l'hypergravité modifient la structure du cytosquelette des cellules T qui est impliquée dans la formation des synapses immunologiques entre LT et CPA, et la mobilité cellulaire (Cogoli-Greuter et al. 1996; Pellis et al. 1997; Sciola et al. 1999; Galimberti et al. 2006; Meloni et al. 2011). C'est d'ailleurs à travers le cytosquelette que sont détectées les modifications mécaniques comme les changements gravitationnels (Ingber 1999) qui sont ensuite transmises à la cellule par l'intermédiaire des voies de signalisation intracellulaires (Fletcher and Mullins 2010). Or la transduction des signaux intracellulaires chez les LT est également altérée par les conditions spatiales. En effet, il a été montré que la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA) est diminuée en microgravité ce qui induit une diminution de l'expression de facteurs de transcription comme NF-κB, CREB et STAT ainsi que de la transcription de gènes cibles impliqués dans l'activation des cellules T (Boonyaratanakornkit et al. 2005; Paulsen et al. 2010; Chang et al. 2012).

3.3.2.2- Effets sur les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont également impactés par les vols spatiaux. Il a par exemple été constaté une diminution du nombre de lymphocytes B spléniques chez des souris ayant volé 13 jours durant la mission STS-118 (Gridley et al. 2009). Cette diminution a été confirmée chez un modèle murin au sol appelé HU (pour Hindlimb Unloading) permettant de mimer certaines conditions du vol spatial (Gaignier et al. 2014; X.-C. Wei et al. 2002). Alors que l'effet des vols spatiaux sur l'immunité cellulaire a largement été étudié ces dernières années, peu d'études existent concernant l'effet des conditions spatiales sur l'immunité humorale des astronautes.

Quelques études ont analysé le taux plasmatique d'Ig pendant un vol de courte ou de longue durée. Deux études ont montré que durant un vol de courte durée, le taux plasmatique des immunoglobulines IgA, IgG et IgM des astronautes n'est pas modifié (Voss 1984; Rykova et al. 2008). En revanche, des résultats contradictoires ont été observés lors des vols de longues durées. Une étude a montré qu'il n'y avait pas de changement du taux d'Ig chez les astronautes (Rykova et al. 2008) tandis qu'une autre étude a révélé des taux plasmatiques d'IgA et d'IgM augmentés (Konstantinova et al. 1993). En outre, nous avons actuellement peu de connaissances concernant l'activation des cellules B dans des conditions de vols spatiaux. Cependant, des études menées sur un amphibien urodèle, *Pleurodeles waltl*, ont permis d'améliorer nos connaissances sur les effets des vols spatiaux sur la réponse humorale après stimulation antigénique. Durant la mission Genesis, des *P. waltl* ont séjourné 5 mois à bord de la station spatiale Mir et ont été immunisés par voie orale. L'analyse des transcrits de chaînes lourdes d'IgM et d'IgY (qui est l'équivalent des IgA sécrétoires chez l'Homme) au sein de la rate de ces animaux, a montré que le niveau d'expression des ARNm codant la chaîne lourde d'IgM est normal alors que celui d'IgY est augmenté de trois fois (Boxio, Dournon, and Frippiat 2005). De plus, dans cette même étude, les auteurs ont analysé l'expression des différentes familles de segments VH constituant la partie variable de la chaîne lourde des IgM et ont montré une expression différente des familles VH, principalement codés par des segments appartenant aux familles VHII et VHVI, chez les animaux en vol comparés aux témoins. Une autre étude a révélé que les segments appartenant à ces deux familles sont différemment exprimés chez ces mêmes animaux (Bascove et al. 2009). Enfin, il a été montré que les hypermutations somatiques, qui diversifient les sites de liaison des anticorps pour améliorer leur affinité, sont deux fois moins abondantes chez les *P. waltl* immunisés à bord de la station Mir, suggérant que l'affinité des anticorps pourrait être moins efficace dans l'espace ce qui diminuerait l'efficacité de la réponse immunitaire humorale (Bascove et al. 2011). L'ensemble de ces résultats suggère donc que les vols spatiaux affectent la production d'anticorps ainsi que le répertoire d'Ac en réponse à une stimulation antigénique.

Malgré toutes ces données sur l'immunité innée, les LT et les LB, l'effet des vols spatiaux sur le système immunitaire reste un sujet d'étude nécessitant d'être approfondi.

4- OBJECTIFS

La conquête de l'espace est toujours d'actualité. L'étude de l'impact des vols spatiaux sur l'organisme est donc nécessaire pour pouvoir développer des moyens permettant de contrecarrer les effets négatifs des conditions spatiales et ainsi maintenir les astronautes en bonne santé. Aujourd'hui nous savons que les stress rencontrés lors des vols spatiaux affaiblissent le système immunitaire des astronautes, favorisant ainsi la survenue de pathologies. Il est par conséquent important d'étudier de manière approfondie l'ensemble des mécanismes affectés et responsables de cet affaiblissement immunitaire. Cependant, compte tenue de la rareté des missions spatiales et du nombre très limité d'échantillons provenant d'astronautes, il est indispensable pour les chercheurs d'utiliser des modèles animaux au sol. Ces modèles animaux ont pour objectifs de mimer au mieux les différents types de stress subis par les astronautes durant les vols spatiaux pour ainsi mettre en évidence les mécanismes à l'origine des perturbations observées. Il est donc important de bien choisir le modèle animal en fonction du système biologique étudié. Différents modèles ont été développés pour étudier l'impact des conditions spatiales sur le système immunitaire. Durant ma thèse, nous avons décidé d'utiliser trois différents modèles animaux pour répondre à trois objectifs différents.

4.1- Premier objectif : Etude du répertoire d'anticorps de *P.waltl*

Le premier modèle animal utilisé pour étudier l'effet des vols spatiaux sur le système immunitaire humoral est le pleurodèle. Le pleurodèle ou *Pleurodeles waltl* (*P. waltl*), est une espèce d'urodèles de la famille des *Salamandridae*. Il a été montré que cet animal partage de nombreuses caractéristiques de l'immunité adaptative avec l'Homme (M. D. Cooper and Alder 2006; Frippiat 2013) notamment au niveau de la machinerie moléculaire de la recombinaison V(D)J requise pour la formation des Ig (Frippiat et al. 2001; Schenten et al. 2013). De plus, le pleurodèle nécessite peu de moyens matériels pour sa reproduction, son développement et son élevage, ce qui facilite son utilisation aussi bien en laboratoire qu'à bord d'une station spatiale (Frippiat 2013). Le pleurodèle est donc un modèle très intéressant pour étudier les effets d'un vol spatial sur le système immunitaire humoral. Cependant, pour certains auteurs la diversité du répertoire d'Ig des amphibiens urodèles serait limitée par

rapport au répertoire des mammifères, considérant ainsi leur système immunitaire comme étant immunodéficient (Charlemagne 1987; H. M. Patel and Hsu 1997; Tournefier et al. 1998). D'autres ont constaté que ces animaux pouvaient présenter une complexité assez importante au niveau de leur répertoire d'anticorps (Fellah, Jacques, and Charlemagne 1994; Golub, Fellah, and Charlemagne 1997). Compte tenu des résultats contradictoires observés au niveau de la diversité du répertoire d'Ac des urodèles et compte tenu du fait que le pleurodèle est un modèle qui a été utilisé avec succès lors de différentes missions spatiales dans le domaine de l'immunologie, nous avons étudié le répertoire de chaînes lourdes d'Ig chez *P. waltl* afin de lever les incertitudes concernant le niveau de diversité de ce répertoire d'anticorps chez cette espèce.

4.2- Deuxième objectif : Effets de stress chroniques socio-environnementaux imprévisibles sur la lymphopoïèse T et le répertoire TCRβ

De nombreuses recherches ont été réalisées afin d'étudier l'effet des vols spatiaux sur le système immunitaire inné et sur les réponses immunitaires des lymphocytes après stimulation antigénique. Cependant, peu d'études se sont penchées sur l'effet de ces vols sur le développement précoce des lymphocytes au sein des organes lymphoïdes primaires. Woods et ses collaborateurs ont observé que la microgravité appliquée à des cultures organotypiques de thymus fœtaux (*via* un clinostat) avait pour conséquence la diminution des cellules T doubles positives et des cellules T simples positives CD4+ et CD8+ (Woods et al. 2003). Par ailleurs, notre équipe a précédemment étudié l'impact de l'exposition à l'hypergravité pendant le développement fœtal murin sur le répertoire TCRβ (Ghislin et al. 2015). L'analyse d'une mini-banque d'ADNc codant pour les chaînes TCRβ, a permis de mettre en évidence une modification de plus de 85% du répertoire TCRβ entre les souriceaux nés de mères soumises à l'hypergravité et les souriceaux témoins. Cette modification de répertoire résulte notamment d'une modification de la fréquence d'utilisation des segments V et J ainsi que d'une modification de la taille et de la composition en acides aminés de la région CDR3. Ces résultats suggèrent que la capacité de reconnaissance des antigènes par le TCR pourrait être altérée. De plus, cette même étude a révélé que les effecteurs de la recombinaison V(D)J étaient également impactés par l'hypergravité. L'ensemble de ces données montre donc que les modifications gravitationnelles affectent la lymphopoïèse T ainsi que le répertoire TCR.

Cependant, les astronautes ne sont pas soumis qu'à des stress gravitaires. Lors de leurs missions, ils sont également confrontés à des stress socio-environnementaux (confinement, éloignement familial, alternance jour/nuit perturbée). C'est pourquoi nous avons voulu savoir si des stress chroniques socio-environnementaux pouvaient, au même titre que les modifications de gravité, altérer la lymphopoïèse T et le répertoire TCRβ. Afin de mimer les stress chroniques socio-environnementaux rencontrés en vol, nous avons utilisés, en collaboration avec l'unité UMR 894 de Paris, un modèle de stress chronique léger appelé CUMS (pour Chronic Unpredictable Mild Stress) (Pardon et al. 2000). Il a été montré que ce modèle induit des modifications du SI adulte, similaires à celles rencontrées lors de vols spatiaux (Gaignier et al 2018). Ainsi, pour répondre à notre question nous avons appliqué ce modèle durant la gestation de souris et avons étudié la lymphopoïèse T et le répertoire TCRβ des souriceaux. Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi de travailler sur les souriceaux exposés à ce modèle durant toute la période de leur développement fœtal afin de s'assurer que la lymphopoïèse T et la création du répertoire de TCRβ n'avaient lieu qu'en condition de stress, éliminant ainsi les effets potentiels d'un développement précédent en conditions normales.

4.3- Troisième objectif : Effets de l'hypokinésie des membres postérieurs et du vieillissement sur la diversité du répertoire BCR murin

Au même titre que la lymphopoïèse T, peu d'études ont été menées sur l'effet des vols spatiaux sur le développement des cellules B. Une étude a montré que les niveaux de transcription des chaînes lourdes d'IgM et du facteur de transcription Ikaros, essentiel au développement des cellules B, sont modifiés lorsque des embryons de *P. waltl* sont soumis à des changements de gravité, suggérant un impact des modifications gravitationnelles sur la lymphopoïèse B. Cette hypothèse a ensuite été confirmée chez des souris soumises à un modèle de suspension anti-orthostatique (HU). Le modèle HU (ou modèle d'hypokinésie des membres postérieurs) est un modèle animal validé par la communauté scientifique et couramment utilisé pour reproduire au sol les principales modifications physiologiques induites par les vols spatiaux comme l'atrophie musculaire et osseuse aux niveaux des membres postérieurs et une augmentation du flux sanguin vers la tête (E. R. Morey-Holton and Globus 2002; Globus and Morey-Holton 2016). Nos travaux menés en collaboration avec

l'unité INSERM UMRS940 (Paris), ont montré que des souris adultes soumises à une hypokinésie des membres postérieurs *via* le modèle HU, présentent des altérations de la lymphopoïèse B (Lescale et al. 2015). De manière intéressante, cette étude a montré que les effets du modèle HU sur la lymphopoïèse B sont comparables à ceux observés chez des animaux âgés. Ainsi, il a été constaté chez les animaux HU et âgés une diminution du nombre de cellules pro-B, pré-B et B-immatures (stades où il y'a formation du BCR par la recombinaison V(D)J) ainsi qu'une diminution de la signalisation par le récepteur à l'IL-7 essentielle à la différenciation des LB. Ces résultats suggèrent que le processus de recombinaison V(D)J, responsable de la diversité du répertoire d'Ac, pourrait être affecté aussi bien par la suspension anti-orthostatique que par le vieillissement. Aussi, pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'impact du modèle HU et du vieillissement sur les effecteurs de la recombinaison V(D)J et la diversité du répertoire BCR. Cette étude avait donc pour objectif, dans la continuité des travaux de Lescale et al, de déterminer si l'hypokinésie des membres postérieurs pouvait induire une immunosénescence prématurée similaire à celle observée chez les souris âgées.

Au cours de ma thèse je me suis donc intéressée à trois problématiques. Dans un premier temps, nous avons étudié le répertoire d'anticorps de l'amphibien *P. waltl* afin d'en connaitre le niveau de complexité et de diversité. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé si un modèle mimant les stress socio-environnementaux rencontrés en vol affecte la lymphopoïèse T et le répertoire TCRβ murin. Enfin, dans un troisième temps, nous avons étudié l'impact du modèle HU et du vieillissement sur la lymphopoïèse B et le répertoire BCR murin.

CHAPITRE II : ETUDE DU REPERTOIRE D'ANTICORPS DE *P.waltl*

1- INTRODUCTION

Comme indiqué dans la partie introduction, le pleurodèle est un des premiers modèles animaux utilisé pour étudier l'effet des vols spatiaux sur le système immunitaire humoral. Le pleurodèle ou *Pleurodeles waltl* (*P. waltl*), est un amphibien urodèle qui passe par une métamorphose au cours de son développement. Il partage de nombreuses caractéristiques de l'immunité adaptative avec l'Homme (Fellah, Kerfourn, and Charlemagne 1994; M. D. Cooper and Alder 2006; Bascove and Frippiat 2010; Frippiat 2013; Schenten et al. 2013) notamment la production d'anticorps par les lymphocytes B (Golub, Fellah, and Charlemagne 1997; Frippiat 2013). Trois isotypes d'immunoglobulines ont été décrites chez *P. waltl* : IgM, IgY et IgP (Schaerlinger, Bascove, and Frippiat 2008). Les IgM sont les Ig les plus abondantes chez *P. waltl*. Les IgY seraient un homologue des IgA de mammifères du fait de leur localisation et de leur co-expression avec une molécule de type sécrétoire au niveau des cellules des muqueuses intestinale et gastrique (Fellah et al. 1992). Les IgP sont exprimées spécifiquement chez les larves de *P. waltl*, donc avant métamorphose, et présentent des similitudes avec les anticorps produits par les cellules B1 de mammifères (Schaerlinger, Bascove, and Frippiat 2008).

Les avis concernant l'efficacité du système immunitaire humoral des amphibiens urodèles sont mitigés. Certains travaux ont montré que la diversité de leur répertoire d'anticorps est plutôt limitée par rapport aux mammifères, considérant ainsi leur système immunitaire comme immunodéficient (Charlemagne 1987; H. M. Patel and Hsu 1997; Tournefier et al. 1998). D'autres ont montré que le répertoire d'Ac de ces animaux est plutôt diversifié et polyréactif (Fellah, Jacques, and Charlemagne 1994; Golub, Fellah, and Charlemagne 1997).

Dans cette étude, nous avons donc étudié le répertoire de chaînes lourdes d'IgY et d'IgM de *P. waltl* afin d'évaluer la diversité de son répertoire d'anticorps.

2- RESULTATS ET DISCUSSION

2.1- Diversité du répertoire de chaînes lourdes d'IgY et d'IgM chez *P.waltl*

2.1.1- Identification et utilisation des sous-groupes IGHV, IGHJ et IGHD chez *P.waltl*

Afin d'étudier la diversité du répertoire de chaînes lourdes d'IgY et d'IgM, nous avons construit, à partir d'un mélange d'ARN total extrait de la rate de deux *P. waltl* adultes âgés de 3 ans, deux banques d'ADNc : une contenant les chaînes lourdes d'IgM (dont la partie constante est codée par Cμ) et une contenant les chaînes lourdes d'IgY (dont la partie constante est codée par Cυ). L'analyse de ces banques nous a permis d'identifier dix sous-groupes IGHV (IGHV1 à IGHV10) (Figure 1 publication 1). De la même manière, nous avons identifié 8 segments IGHJ et 6 segments IGHD potentiels (Figure 2 publication 1). La composition du locus IGH de *P. waltl* est donc similaire à celle des loci IGHV de *A. mexicanum* et *X. laevis* qui présentent un grand nombre de segments IGHV également organisés en 11 sous-groupes, (Schwager et al. 1991; Golub and Charlemagne 1998) ainsi qu'une diversité jonctionnelle importante (Haire et al. 1990; Golub, Fellah, and Charlemagne 1997). Cette complexité structurelle du locus IGH contribue à la diversité de leur répertoire.

Nous avons ensuite voulu savoir à quelles fréquences sont utilisés les différents sous-groupes IGHV.

Pour cela, pour chaque banque (IgM et IgY), nous avons hybridé des clones choisis aléatoirement avec des sondes spécifiques des différents sous-groupes IGHV. Ainsi, dans les deux cas, nous avons mis en évidence l'existence d'un biais dans l'utilisation des différents sous-groupes (Figure 5 publication 1). Ce type de biais est commun à plusieurs espèces et a été observé chez *A. mexicanum* et chez l'Homme (Cook and Tomlinson 1995; Golub and Charlemagne 1998). L'existence de ce biais pourrait être liée à la structure chromatinienne du locus. En effet, plusieurs travaux ont démontré que le remodelage chromatinien influence le choix des segments géniques durant la recombinaison V(D)J (C.-R. Xu et al. 2008; Ndifon et al. 2012).

En revanche, en ce qui concerne le choix des segments IGHD et IGHJ, nous n'avons pas observé de segments préférentiellement utilisés ce qui confère aux *P. waltl* un niveau supplémentaire de diversité combinatoire au niveau des CDR3 des chaînes lourdes d'IgY et d'IgM (Tableau 1 de la publication 1).

2.1.2- Etude des régions CDR de chaînes lourdes d'IgM et d'IgY

Les domaines variables de chaînes lourdes et légères des immunoglobulines sont composés de trois domaines hypervariables, CDR1, CDR2 et CDR3. Dans l'espace, ces régions constituent des boucles, notées H1 à H3 pour la chaîne lourde et L1 à L3 pour la chaîne légère, séparées par des feuillets béta. La structure tridimensionnelle de la région variable d'une Ig est relativement conservée entre les espèces. Il a d'ailleurs été montré que les régions hypervariables des Ig possèdent un nombre limité de structures canoniques basées sur la longueur des boucles et le présence d'acides aminés clés (Al-Lazikani, Lesk, and Chothia 1997; North, Lehmann, and Dunbrack 2011).

Dans un premier temps, nous avons analysé les différentes combinaisons de structures canoniques des boucles H1 et H2 (Figure 1 publication 1). Pour chacune des boucles, nous avons trouvé trois structures déjà décrites dans la littérature. Nous avons observé quatre sous-groupes IGHV présentant des structures inconnues pour la boucle H1 contre un sous-groupe pour la boucle H2. Ces résultats suggèrent que les amphibiens urodèles possèdent des structures canoniques de boucles H1 et H2 différentes des mammifères. En revanche, nous avons noté que les domaines IGHV de *P. waltl* présentent 8 combinaisons possibles de boucles H1-H2 ce qui est très proche du nombre de combinaisons possibles (10 combinaisons) pour les domaines IGHV humains et murins (Almagro et al. 1997).

Dans un second temps, nous avons évalué la diversité au sein de la région CDR3 qui est la région la plus variable de l'anticorps et est impliquée dans la reconnaissance spécifique des antigènes. Pour cela, nous avons déterminé pour plusieurs espèces la diversité jonctionnelle dans les CDR3 d'IgM et d'IgY à l'aide du ratio R défini comme le rapport de la somme D+N+P (somme de la taille du segment IGHD (D), du nombre de nucléotides non génomiques (N) et du nombre de nucléotides palindromiques (P)) divisée par la longueur du CDR3 en nucléotides (Tableau 2 publication 1). Ainsi, nous avons observé que la diversité des CDR3 de chaînes lourdes d'IgY d'urodèles est similaire à celle des chaînes lourdes d'IgA de souris ce qui indique que la diversité du répertoire d'IgY chez l'amphibien urodèle est aussi importante que chez ce mammifère. Pour le CDR3 de la chaîne lourde μ de *P. waltl* et d'*A. mexicanum*, nous avons observé que le rapport R est plus faible que celui de la souris, indiquant une diversité plus faible des IgM chez les urodèles.

Enfin, l'analyse de la composition en acides aminés des CDR3 de chaînes lourdes μ et υ de *P. waltl,* comparée aux autres espèces, a montré que les chaînes lourdes μ des amphibiens *P. waltl* et *A. mexicanum* présentent 1,6 à 2,2 fois plus de glycines dans leurs CDR3 par rapport aux CDR3 de souris (Figure 6 publication 1). La glycine étant un acide aminé associé à la flexibilité conformationnelle, ces résultats indiquent que les IgM d'amphibiens pourraient présenter une plus grande plasticité dans leur site de liaison à l'antigène. Cette flexibilité pourrait augmenter les réactions croisées et permettre à leurs anticorps de s'adapter à de nombreux épitopes différents ce qui pourrait compenser, en partie, la diminution de la diversité observée précédemment avec les valeurs R (Manivel et al. 2000).

2.2- Caractéristiques du répertoire de chaînes lourdes d'IgY et d'IgM de *P. waltl*

L'étude des associations VH-D-JH, présentées dans le tableau 1 (publication 1), montre que le sous-groupe IGHV1 s'associe préférentiellement à IGHD1 et IGHJ5 dans les chaînes lourdes d'IgY de *P. waltl*. Chez l'axolotl non immunisé, il a également été observé une expansion clonale d'un réarrangement IGHV-D-JH qui diffère de celui que nous avons observé chez *P. waltl* (Golub and Charlemagne 1998). Or, aucune expansion clonale n'a été observée dans les CDR3 d'IgA de souris (Tableau 2 publication 1), ce qui suggère que cette expansion clonale d'IgY pourrait être une particularité des amphibiens urodèles. A ce jour, la signification biologique de cette expansion est inconnue.

Par ailleurs, nous avons constaté que les séquences des sous-groupes IGHV5 et IGHV6 sont assez similaires (environ 60-70% d'homologie). Or, il apparait que ces sous-groupes présentent des cystéines supplémentaires au niveau des régions CDR1 et CDR2 (Figure 1 publication 1). Une recherche dans la base de données IMGT/LIGM-DB a révélé que ce type de domaine IGHV est restreint aux amphibiens urodèles (Figure 3 publication 1). Compte tenu de la présence de cystéines supplémentaires dans les boucles CDR1 et CDR2 des sous-groupes IGHV5 et IGHV6 de *P. waltl*, nous avons émis l'hypothèse qu'un pont disulfure pourrait relier les boucles correspondantes. Pour tester cette hypothèse, des modèles tridimensionnels des domaines variables de ces deux sous-groupes IGHV ont été générés en utilisant une approche basée sur l'homologie avec d'autres modèles préétablis grâce aux logiciels CPHmodel 3.2

(Nielsen et al. 2010) et ITasser (Y. Zhang 2008). Ces modélisations ont révélé qu'un pont-disulfure entre les boucles CDR1 et CDR2 des sous-groupes IGHV5 et IGHV6 est possible (Figure 4 publication 1). Ces ponts disulfures sont susceptibles de rigidifier le site de liaison à l'antigène et d'affecter par conséquent la réponse anticorps.

3- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons montré que la diversité des répertoires de chaînes lourdes d'IgY et d'IgM de *P. waltl* est importante. En effet, la diversité du répertoire de chaînes lourdes d'IgY de *P. waltl* est similaire à celle des IgA de mammifères. Nous avons également montré que la diversité du répertoire des chaînes μ de *P. waltl* est similaire à celle observée chez les têtards anoures et les axolotls adultes. Cependant, les sites de liaison des IgY et des IgM de *P. waltl* pourraient être plus flexibles et donc plus polyréactifs que chez les mammifères, ce qui pourrait conférer aux anticorps de cette espèce la capacité de se lier à un grand nombre d'antigènes. Nous avons également noté des caractéristiques spécifiques aux amphibiens urodèles : une expansion clonale d'IgY dont la signification biologique est inconnue et la présence de cystéines supplémentaires dans les boucles CDR1 et CDR2. La modélisation de ces boucles suggère que ces cystéines supplémentaires peuvent permettre l'établissement d'un pont disulfure entre CDR1 et CDR2 pouvant affecter le site de liaison à l'antigène.

À l'avenir, il serait intéressant d'analyser les chaînes légères de *P. waltl* afin de déterminer si elles portent également des caractéristiques structurelles spécifiques aux urodèles. Il serait aussi intéressant d'étudier la structure cristallographique d'une association VH/VL afin de déterminer les conséquences des pont disulfures supplémentaires sur la structure du paratope.

PUBLICATION 1 : L'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*, possède un répertoire varié de chaînes lourdes d'immunoglobulines présentant des caractéristiques polyréactives et spécifiques à l'espèce

Developmental and Comparative Immunology 53 (2015) 371–384

Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

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

The urodele amphibian *Pleurodeles waltl* has a diverse repertoire of immunoglobulin heavy chains with polyreactive and species-specific features

Coralie Fonte [a], Arnaud Gruez [b], Stéphanie Ghislin [a, 1], Jean-Pol Frippiat [a, *, 1]

[a] *EA7300, Stress Immunity Pathogens Laboratory, Faculty of Medicine, Université de Lorraine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, F-54500, Vandœuvre-lès-Nancy, France*

[b] *Molecular and Structural Enzymology Group, Université de Lorraine, IMoPA, UMR 7365, F-54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 June 2015
Received in revised form
5 August 2015
Accepted 9 August 2015
Available online 13 August 2015

Keywords:
Cold-blooded vertebrate
Antibody
Diversity
Gene segments
Polyreactivity

ABSTRACT

Urodele amphibians are an interesting model because although they possess the cardinal elements of the vertebrate immune system, their immune response is apparently subdued. This phenomenon, sometimes regarded as a state of immunodeficiency, has been attributed by some authors to limited antibody diversity. We reinvestigated this issue in *Pleurodeles waltl*, a metamorphosing urodele, and noted that upsilon transcripts of its IgY repertoire were as diverse as alpha transcripts of the mammalian IgA repertoire. Mu transcripts encoding the IgM repertoire were less diverse, but could confer more plasticity. Both isotypes present potential polyreactive features that may confer urodele antibodies with the ability to bind to a variety of antigens. Finally, we observed additional cysteines in CDR1 and 2 of the IGHV5 and IGHV6 domains, some of which specific to urodeles, that could allow the establishment of a disulfide bond between these CDRs. Together, these data suggest that urodele antibody diversity is not as low as previously thought.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Immunoglobulins share a common basic structure composed of two identical heavy (H) chains and two identical light (L) chains joined by disulfide bonds. H chains consist of one N-terminal variable (V) domain followed by several constant (C) domains, while L chains comprise one N-terminal V domain and one C domain. C domains define the effector functions that are characteristic of a given class of Ig, whereas V domains display unique sequences and structures that define antigen specificity.

The creation of immunoglobulin diversity begins during B cell development, when a variable gene segment (IGHV), a diversity segment (IGHD, only for H chains) and a joining segment (IGHJ) are associated by V(D)J recombination. This assembly procedure is mediated by recombination-activating genes 1 and 2 (RAG1 and RAG2) and is supported by DNA repair factors complexes such as Ku-Artemis-DNA-PK and XLF-XRCC4-DNA ligase IV (Gellert, 2002).

The variable domains of the heavy and light chains (VH and VL, respectively) consist of 4 framework regions (FR1 to FR4) that are responsible for protein folding and structure and 3 complementarity determining regions (CDR1 to CDR3, also called hypervariable regions). Variability within the six polypeptide loops encoded by the 3 CDRs of VH and the 3 CDRs of VL forms the basis of the structural diversity required for antigen recognition. The structural diversity of these loops can create antigen binding sites in a variety of shapes, ranging from almost flat surfaces to deep cavities (Alzari et al., 1990; Amit et al., 1986). Amongst the six loops that form the antigen binding site, the loop encoded by heavy chain CDR3 is the longest and most variable because it comprises the 3′-end of IGHV, the entirety of IGHD and the 5′-end of IGHJ segments that are assembled during V(D)J recombination. Heavy chain CDR3 diversity is further increased by Artemis, which opens RAG-induced DNA hairpins at the coding ends and generates palindromes (P nucleotides), and the terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt), which

Abbreviations: CDR, complementarity determining region; FR, framework region; H1 and H2, antigen-binding site loops encoded by CDR1 and CDR2; P, palindromic region; RAG, recombination-activating gene; rf, reading frame; r.m.s.d., root mean square deviation; SHM, somatic hypermutation; Tdt, terminal deoxynucleotidyl transferase.

* Corresponding author.
E-mail address: jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr (J.-P. Frippiat).

[1] Codirected this study.

http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.08.006
0145-305X/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

adds N-nucleotides at V–D–J junctions. Heavy/light chain pairing, secondary recombination and somatic hypermutation further increase Ab diversity.

Urodele amphibians are the modern representatives of the most primitive tetrapod vertebrates and represent an interesting model because they possess the cardinal elements of the vertebrate immune system (i.e., B lymphocytes producing IgM, IgY and IgX antibodies, T lymphocytes expressing T cell receptors (TR) and major histocompatibility MH1 (class I) and MH2 (class II) proteins) (Fellah et al., 1992; Golub and Charlemagne, 1998; Kaufman et al., 1995; Salvadori and Tournefier, 1996; Sammut et al., 1997; Schaerlinger and Frippiat, 2008; Tournefier et al., 1998; Völk et al., 1998); however, their immune response is apparently subdued, limited and slow compared to mammals and anuran amphibians. Indeed, it was reported ≥28 years ago that the humoral responses of urodeles (*Ambystoma mexicanum*, *Pleurodeles waltl* and *Triturus alpestris*) to a wide variety of antigens were poor. When antibodies were elicited, the titers were considerably lower than in mammals, and the peak of production was reached after a lag of 7–12 weeks (Charlemagne, 1987, 1979; Charlemagne and Tournefier, 1977; Ching and Wedgwood, 1967; Houdayer and Fougereau, 1972; Tournefier, 1975; Tournefier and Charlemagne, 1975). This phenomenon is sometimes regarded as a state of immunodeficiency or limited antibody diversity. However, published cDNA sequences of axolotl T cell receptor beta variable (TRBV) regions (Fellah et al., 1994b) and immunoglobulin heavy chains (Fellah et al., 1994a; Golub et al., 1997) showed no obvious repertoire restrictions, whereas Patel and Hsu (1997) suggested that abbreviated junctional sequences impoverished antibody diversity in urodele amphibians. Given these contradictory results, we studied the immunoglobulin heavy chain (IGH) repertoires of the Iberian ribbed newt *P. waltl*, a metamorphosing example of urodele amphibian contrarily to *A. mexicanum* which is neotenic; meanings that they reach adulthood without undergoing metamorphosis. Previous studies performed on this amphibian showed that it expresses three Ig isotypes (IgM, IgY and IgP) (Schaerlinger et al., 2008). IgM are multimeric antibodies and represent the most abundant isotype throughout the life of *P. waltl*. Urodele IgY are believed to be the physiological counterpart of mammalian IgA because previous works showed that IgY mRNAs are abundant in the intestine of these animals and more importantly that IgY antibodies and the secretory component (SC) are expressed by the same cells in the intestinal mucosa of *A. mexicanum* thereby suggesting a physical association between these two proteins (Fellah et al., 1992; Schaerlinger et al., 2008). IgP are specific to *P. waltl*, are mostly expressed prior to metamorphosis and present some similarities with natural antibodies produced by mammalian B1-cells. Furthermore, several immunologically important genes and transcripts (i.e., those encoding AID, CD3γ/δ, C3 complement component, DNA polymerase mu, Ikaros, RAG1 and RAG2) were shown to be conserved in *P. waltl*, with expression patterns similar to those observed in mammals (Bascove and Frippiat, 2010; Boudarra et al., 2002; Frippiat et al., 2001; Guéguinou et al., 2014; Hoegg et al., 2004; Ropars et al., 2002; Schenten et al., 2013).

In this study, we show that *P. waltl* possesses at least ten subgroups of IGHV gene segments, eight IGHJ segments and six IGHD segments to create diverse repertoires of IgY and IgM heavy chains that present polyreactive features. We observed an IgY clonal expansion in the spleen of adult *P. waltl*, as previously shown in the spleen of unimmunized axolotls, whose biological significance is still unknown. We identified IGHV gene segments with a stretch of three cysteines in CDR1 that were specific to urodele amphibians and noted that gene segments of two IGHV subgroups likely have a disulfide bond linking CDR1 and CDR2.

2. Materials and methods

2.1. Animals and RNA extraction

P. waltl (3-yr-old females) were reared in our animal facilities at 18–20 °C under controlled conditions approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (agreement DDSV54/SPA/07/130) and treated in accordance with national legislation and the European Communities Council Directive on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes 86/609/EEC. Total RNA was isolated from the spleens of adult *P. waltl* using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA concentration and purity were determined using a NanoDrop spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, France). RNA quality was verified by running 1 μg of RNA on a 0.8% agarose gel.

2.2. Construction of the VH IgM and VH IgY libraries

These libraries were built by anchored PCR. Total RNA extracted from a mixture of the spleens of two 3-year-old adult *P. waltl* was used to amplify the V–D–J rearrangements of mu (IgM) or upsilon (IgY) transcripts by 5′-RACE PCR using the Smart Race cDNA kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) following manufacturer's instructions. Briefly, first-strand cDNA was synthesized using the modified oligo dT primer provided in the kit and M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). This enzyme adds 3–5 dC nucleotides to the 3′ end of the first-strand cDNA. The oligonucleotide SMART II with a 3′ dG tail anneals to the poly C cDNA tail and serves as an extended template for RT. Thus, a complete cDNA copy of the original RNA is synthesized with the SMART sequence added at the ends. Amplifications were then performed using the UPM primer from the kit (which anneals to the SMART sequence) and primers hybridizing to the CH1 exon of *P. waltl* mu (primer CMGSP1) or upsilon (primer CYGSP1) transcripts (Table S1). Two PCR products 0.6 kb in length were obtained: one containing IgM V–D–J rearrangements and one containing IgY V–D–J rearrangements. These products were gel purified and cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Lyon, France) to produce the VH IgM and VH IgY libraries. The same strategy was employed to build VH IgM libraries using total RNA extracted from the spleens of two other adult *P. waltl* of the same age that were randomly chosen in the animal facility.

2.3. Library screening

A total of 192 clones randomly chosen from the VH IgM (96 clones) and the VH IgY (96 clones) libraries prepared using RNA extracted from the mixture of the spleens of the two adult *P. waltl* were handpicked in an orderly manner onto LB plates containing ampicillin and grown at 37 °C overnight. Then, colonies were lifted onto Hybond N^+ nylon membranes (Amersham, Courtaboeuf, France) and lysed by placing the membranes onto Whatmann paper soaked with 0.5 N NaOH and 1.5 M NaCl for 15 min. Afterwards, the membranes were placed onto Whatmann paper soaked with a neutralization solution (0.5 M Tris pH 7.5, 1.5 M NaCl), washed in 2 × SSC (300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0) and baked at 80 °C for 2 h to fix the DNA. IGHV subgroup-specific probes were prepared by PCR using the oligonucleotides presented in Table S1 and labeled with [α^{-32}P]dCTP using the Random Primed DNA labeling kit (Roche, Mannheim, Germany). The prehybridization, hybridization and washing steps were performed as described elsewhere (Boxio et al., 2005; Dard et al., 1997). The filters were recycled by washing at 80 °C for five minutes in 2 × SSC to allow successive probing.

2.4. Cloning of a IGHV1 subgroup gene segment

We used the Universal GenomeWalker kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA), *P. waltl* genomic DNA and the VH1gen primer (Table S1) defined in the leader exon of cDNAs containing an IGHV1 domain to isolate an IGHV1 gene segment in the germline configuration. The Universal GenomeWalker kit generated PCR products that began at the 3′ end of the VH1gene primer and extended into the adjacent genomic DNA. These products were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Lyon, France) and sequenced (Acc no KR812575).

2.5. Sequence analysis

Translation was performed using the Transeq program available in the portal for bioinformatic analyses of the Pasteur Institute (http://mobyle.pasteur.fr). BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) and ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) were used for sequence alignments. Tools available in the portal of IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system (www.imgt.org/) were used to identify FR-IMGT, CDR-IMGT, conserved amino acids and signature motifs important for immunoglobulin function and structure.

2.6. Modeling

Three-dimensional models of the *P. waltl* IGHV5 and IGHV6 domains were established by homology-based modeling using the CPHmodel 3.2 (Nielsen et al., 2010) and ITasser (Zhang, 2008) software. Three antibody crystal structures were selected as templates (1ACY, 4LEX and 4LKX) by the CPHmodel 3.2 program to construct the CU20, CU21, CU40, CU48, CU85 and CU95 structures, while the ITasser algorithm used two other PDBs as templates (4HJJH and 1DNOD). The root mean square deviations (r.m.s.d.) between these 5 crystal structures did not exceed 1 Å on the 129 Cα atoms. Superimposition revealed close homologous VH models with calculated r.m.s.d.'s between 0.306 and 0.765 Å on the 129 Cα atoms using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC). Agreement between sequence alignments, predicted secondary structures using the PromalS3D software (Pei et al., 2008) and the models has been carefully checked to assess the location of the Cys residues within the three-dimensional models.

2.7. Statistics

Homogeneity of variance was determined using the Levene test. When homogenous variances were observed, ANOVA analyses and post-hoc PLSD Fisher tests were performed. When variance was not homogeneous, Kruskal–Wallis nonparametric tests and post-hoc Dunn's tests were performed. P-values ≤ 0.05 indicate significance.

3. Results and discussion

3.1. P. waltl possess 10 IGHV subgroups, including 2 with disulfide bonds linking CDR1 and CDR2

We sequenced the inserts of 35 randomly chosen clones from the VH IgM library and 38 randomly chosen clones from the VH IgY library, both of which were constructed from a mixture of the spleens of two adult *P. waltl*. A total of 33 unique IGHV sequences were identified. Alignment of these sequences allowed the definition of six subgroups based on percentages of nucleotide sequence identity (≥75% or 80% according to IMGT or Brodeur and Riblet (1984), respectively). Probes specific for these six IGHV subgroups were used to screen 192 clones randomly chosen from these VH IgM (96 clones) and VH IgY (96 clones) libraries by colony hybridization. Four clones that did not hybridize to these probes allowed the discovery of four additional IGHV subgroups (IGHV7, IGHV8, IGHV9 and IGHV10). Sequences within any given IGVH subgroup had at least 85% nucleotide sequence identity and 76% amino acid identity. The most similar subgroups were IGHV5 and IGHV6 (60–70% homology between members of these subgroups at the amino acid level).

Fig. 1 shows the deduced amino acid sequences classified by subgroup and the combinations of predicted structures, as defined by Chothia's group, for the antigen-binding site loops encoded by CDR1 and 2 (the H1 and H2 loops, respectively) (Barré et al., 1994; Chothia et al., 1989; Chothia and Lesk, 1987; Tramontano et al., 1990). Three structures previously described for the H1 and H2 loops are present in *P. waltl* IGHV domains. The structures of the H1 loops for the IGHV1, IGHV5, IGHV8 and IGHV10 subgroups are unknown (indicated by an interrogation point in Fig. 1). The structure of the H2 loop for the IGHV2 subgroup is also unknown. Interestingly, several axolotl IGHV domains also presented no significant similarities with mammalian canonical structures (Golub and Charlemagne, 1998). This observation suggests that some loop structures are different in urodele amphibians. With the exception of IGHV3 and IGHV9, each subgroup had its own combination of canonical structures for H1 and H2. Thus, 8 combinations of H1–H2 loops are possible, which is similar to the number of combinations (ten) possible for human and mouse IGHV domains (Almagro et al., 1997).

P. waltl VH domains possess the canonical structural features of vertebrate IGHV domains. Indeed, they contain the conserved tryptophan (Trp41 and Trp52) and cysteine (Cys23 and Cys104) residues that are typical of Ig variable domains. Cys23 and Cys104 form an intra-domain disulfide bond in all *P. waltl* IGHV domains, with the exception of members of the IGHV5 subgroup in which Cys104 is replaced by a glycine. Several structurally important amino acids are frequently present (i.e., Gln1, Pro15, Gly49, Arg75, Tyr/Phe102, Tyr103, Ala105 and Arg106). The last five amino acids form the YYCAR stretch that is present in most vertebrate IGHV sequences. Furthermore, amino acids involved in VH/VL interactions (Val42, Gln44, Leu50, Trp52, Tyr103, Ala105 and Trp118 at the beginning of FR4) (Figs. 1 and 2) are present. Only one of these residues is absent in subgroups IGHV2, IGHV3, IGHV4 and IGHV6; in these subgroups, Val42 is replaced by isoleucine, another hydrophobic amino acid.

IGHV5 domains present one additional cysteine in CDR1 and CDR2, whereas some IGHV6 domains possess 1 to 3 additional cysteine(s) in CDR1 and one additional cysteine in CDR2. From Fig. 1, it appears that IGHV6 gene segments containing 3 additional Cys in CDR1 are quite different from those containing only one additional cysteine in CDR1, thereby suggesting that the CU21 and CU40 sequences could derive from a different IGHV6 gene segment. Additional Cys in the CDRs have been reported in camel immunoglobulins (Nguyen et al., 2000) and nurse shark antigen receptors (NAR) (Roux et al., 1998), which are composed only of heavy chains. However, it is unlikely that *P. waltl* presents antibodies without light chains because: i) as indicated above, amino acids involved in VH/VL interactions are present and ii) we previously showed that the first constant domain of the IgM and IgY heavy chains possess a cysteine that could be involved in light chain binding (Schaerlinger et al., 2008).

A search in the IMGT/LIGM-DB database revealed that IGHV domains having one additional cysteine at the end of CDR1 and one additional cysteine at the beginning of CDR2 (as in *P. waltl* IGHV5 sequences) are frequent in most studied fish: 12 VH found for the channel catfish Ictalurus punctatus (IGHV6S1 (Acc no U09724), IGHV6S3 (Acc no U67445), IGHV6S5 (Acc no AF161280), IGHV6S6

```
                 FR1-IMGT          CDR1-IMGT      FR2-IMGT      CDR2-IMGT                FR3-IMGT                CDR3-IMGT
                  (1-26)            (27-38)        (39-55)       (56-65)                 (66-104)                (105-117)
                 ________________________ ______________ ________________ ________ ____________________________________________ __
                 1       10        20        30         40        50        60       70        80        90        100
                 .........|.........|...... ...|........ .|.........|..... ....|..... ....|.........|.........|.........|.... ..

IGHV1
     H1-H2
CU4    ?-2  QVTLQESGP.GTLRPSETLTLTCKVS TSLSGYY..... WDWVRQHPGRGLEWLGR IHFSGSPT.. HYATSLQ.SRITITLDSSKNEYFLRLTSMRPEDSAKYYC AR [7-8]
CU51   ?-2  ---------.---------- ------.... ---------- -------.. -------.--V---------- -- [7-8]
CU12   ?-2  ----H----.---------- ------.... ---------- -------.. -------.---------- -- [7-8]
CY4    ?-2  ----H----.---------- ------.... ---------- -------.. -------.N----------D------T---------- -- [7-8]
CY38   ?-2  ----H----.---------- ------.... ---------G------- -------.. -------.N----------D------T---------- -- [7-8]
CY8    ?-2  ----H---L.----------I---- ------.... ---------- -------.. -------.N----------T---------- -- [7-8]
CY30   ?-2  ----H----.----------I---- ------.... ---------- -------.. -------.N----------T---------- -- [7-8]
CY33   ?-2  ----H----.----------I---- ------.... ---------- -------.. -------.N----------D------T---------- -- [7-8]
CY51   ?-2  ----H----.---------- ------.... ---------T------- -------.. -------.T---------- -- [7-8]
CU6    ?-2  ----H----.---------- ------.... ---------- -------.. -------.---------- -- [7-8]

IGHV2
     H1-H2
CY17   1-?  QITLTQSGS.EIRKPGESVKVKCLVS GFNINRYW.... MNWIRQAPGRGLEWVAR YNSGSSP... PHYSSDA.VKGRFTASTDSSSLYLQMNNLKTEDTGVYYC AR [8-7]
CY37   1-?  ---------.----------M----- -----N--.... ---------- -------... -------.--------R---------- -- [8-7]
CU9    1-?  ---------.----------L----- -----S--.... ---------- -------... -------.---------- -- [8-7]
CU29   1-?  --S------.----------L----- -----S--.... ---------- -------... -------.---------- -- [8-7]
CU14   1-?  ---------.----------L----- -----S--.... -S-V---------- -H---N-... -------.----------S---------- -- [8-7]
CU36   1-?  ---------.----------L----- -----S--.... -S-V-------P----- -H---N-... -------.----------S---------- -- [8-7]

IGHV3
     H1-H2
CY12   1-3  EVILTQSGD.VVTKPGGSHELSCRGS GFNFGSYH.... ITWIRQSPGKGLEWVAI IWYDNTQK.. YYSPSVQ.GRFIISRDNGASTASLHMSNLKTEDTANYYC AR [8-8]
CY80   1-3  ---------.---------- --------.... ---------- -------.. -------.----------V------- -- [8-8]
CY18   1-3  ---------.---------- --R--R--.... -S---------- -------.. -------.---T-----A-R----------K--- -- [8-8]
CY19   1-3  ---------.---------- --S-----.... -S---------- -------.. -------.---T-----A----------K--- -- [8-8]

IGHV4
     H1-H2
CU61   2-2  QITLLESGP.GMLKPAETFTLSCKVT GFTISSNYW... WAWIRQLPGKGLEWIGQ IRYDAAAI.. YYADSLK.SRSTITKDNSKNEYYLQVKDARAEDSGVYYC AR [9-8]
CU28 2-2/3  ---------.---------- ---------... ---------- -EHND-RK.. F-S-L--.--TS-----AR------L---------- G- [9-8]

IGHV5
     H1-H2
CU85   ?-1  QLTLLEFGP.ANLKPSETLRLTCKVT GSMSGNYC.... WHWVRQAPGKGLEWLAR TCWEGSI... NYSQSLK.DRLSITKDTAKNEFYLQMTGMRSEDTARYYG AG [8-7]
CU52   ?-1  ---------.---------- --------.... ---------- -------... -------.---------- -R [8-7]
CU48   ?-1  ---------.------K--------- --------.... ---------- -------... -------.---------- -R [8-7]
CY13   ?-1  ---------.---------- --------.... ---------- -------... -------.----------V---- -R [8-7]

IGHV6
     H1-H2
CU37   2-1  QVTLQESGP.GTVKPSETLKLTCKVT GYSISSGYY... WGWIRQPPGKGLEWLGQ IDSSGSI... YYSESLK.SRLSVTRDTSLNEFYLQMSNMRAEDTATFYC AR [9-7]
CU20   2-1  ---------.---------- --------C... -Y----------G -CA---T... ----P--.----A---------- -- [9-7]
CY29   2-1  ----L----.---------- --------C... -N----A---------G -CHE--T... -------.----A---------- -- [9-7]
CU95   3-1  ----L----.---------- -F--TTSG-C.. -N----------R -CYD--T... ----P--.----A---K-I---------T------M--- -- [10-7]
CU40   3-1  ----L----.R--------R-A---- -V-LTDSCCC.. -N----------R -Y-T--T... -------.---T------I--Y------V-G-------- V- [10-7]
CU21   3-1  ----L----.---------- -V-LTDSCCC.. -N-N----------G -CYD--T... ---Q---.---T---E--IS---------- -- [10-7]

IGHV7
     H1-H2
CU91   1-1  QVVLIQTGS.EMKKPGESVKLKCKGT GFTMSTTG.... MNWVRQAPGKGLEWLAH YYGPNDK... YYNSAIQ.DRFTASKD..NSNVYLQMDRLKAEETANYYC AT [8-7]

IGHV8
     H1-H2
CU3    ?-3  DVQLVQSAS.QTVAPGASVKLSCNIL TFTGSW...... IDWVRQAPGRGLEWIGR IHPDEKTI.. NYGSSFS.GRFILSRVNSQSRVYLLVNGLKTEDTGVYYC AR [6-8]

IGHV9
     H1-H2
CU78   1-3  DVVLTQSGE.GVKKPGESHKLTCQGS GFSFGSYR.... MSWVRQPSGKGLEWIAY ISTDSNPI.. YYADSVK.GRFTISRDDSSSKVFLQMNSLRTEDTGTYYC AR [8-8]

IGHV10
     H1-H2
CU5    ?-1  QFTLVQSGE.GLLKPSQSLALTCAVS GASITDSSKVWS IQWVRQPPGKGLQWVGG VWHDGTI... RYPQSLQ.SRCTVTRNTSKNQVYLQLRQMTADDQGTYYC AR [12-7]
```

Fig. 1. Amino acid sequences deduced from the 36 unique nucleic IGHV sequences of *P. waltl* (22 from mu cDNAs designated by CU and 14 from upsilon cDNAs designated by CY, followed by the clone number). Sequences are classified into 10 IGHV subgroups according to the percentages of nucleotide identity. CDRs and FRs were defined according to IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® (www.imgt.org/). Positions are from the IMGT unique numbering. Dashes denote amino acids identical to the first sequence in each IGHV subgroup. Dots indicate gaps according to the IMGT unique numbering. Predicted structures adopted by the H1 and H2 loops encoded by CDR 1 and 2, respectively, are indicated on the left. Key amino acids defining H1 structures are underlined once; amino acids defining H2 structures are underlined twice. An interrogation point indicates an unknown structure. Noncanonical cysteine residues in the CDRs of IGHV5 and IGHV6 subgroups are shaded. Lengths of CDR1-IMGT and CDR2-IMGT are indicated between square brackets on the right. The sequence accession numbers are AJ575764–AJ575798 and AJ575801.

(Acc no AY238362), IGHV9S1 (Acc no AY238378), IGHV9S2 (Acc no AY238367), IGHV9S3 (Acc no AY238368), IGHV10S1 (Acc no AY238379), IGHV10S2 (Acc no AY238369), IGHV10S3 (Acc no AY238370), IGHV12S1 (Acc no AY238381) and IGHV12S2 (Acc no AY238373)); 7 VH found for the zebrafish Danio rerio (IGHV5-2 (Acc no BX649502), IGHV5-4 (Acc no BX649502), IGHV5-5 (Acc no BX649502), IGHV5-8 (Acc no BX649502), IGHV7-1 (Acc no BX649502), IGHV8-1 (Acc no BX649502) and IGHV8-2 (Acc no

A) **B)**

IGHJ1 — Y Y F D Y W G Q G T F V T V T T (FR4 from W; IGHV A R = positions 105 106; W = 118)

Cl	IGHV	IGHD (rf)	Nb	CDR3 (aa)	D+N+P (bp)	IGHV (105 106)	CDR3 junction	IGHJ1	IGHV	CDR3 (YYFDY)	FR4 (WGQGTFVTVTT)
CU21	6	6(2)	1	15	24	GCTCGA	GTTCAGAGAGCCCTACAGCAGAGG	TACTACTTCGATTACTGGGGACAAGGGACCTTTGTCACCGTCACCACA	AR	VQRALQQR-----	-----------
CU27	6	6(2)	1	11	12	GCTC**GA**	**TC**ACTACAGTAC	TACTACTTCGATTACTGGGGACAAGGGACCTTTGTCACCGTCACCACA	AR	SLQY-----	-----------
CU4	1	6(3)	1	10	11	GCGAGA	GATAGCAGCAG	CTACTTCGATTACTGGGGACAAGGGACCTTTGTCACCGTCACCACA	AR	DSSS----	-----------
CU35	2	2(1)	1	13	18	GCACGG	GAGGAGGGAGCAATTAGC	TACTACTTCGATTACTGGGGACAAGGGACCTTTGTCACCGTCACCACA	AR	EEGAIS-----	-----------
CU85	5	5(1)	1	10	12	GCCGGA	GATCAACTGGG	CTACTTCGATTACTGGGGACAAGGGACCTTTGTCACCGTCACCACA	AG	DQLG----	-----------
CU52	5	5(1)	1	10	12	GCCAGA	GAGGAACTGGG	CTCCTTCGATTACTGGGGACAAGGGACCTTTGTCACCGTCACCACA	AR	EELGS---	-----------
CU91	7	4(2)	1	9	9	GCTACA	TGGGAGCC	CTACTTCGATTACTGGGGACAAGGGACCTTTGTCACCGTCACCACA	AT	WEP----	-----------
CY5	1	5(1)	1	9	9	GCGAGA	CAACTGGG	CTACTTCGATTACTGGGGACAAGGGACCTTTGTCACCGTCACCACA	AR	QLG----	-----------
CY7	2	4(1)	1	11	17	GCACGG	AATATGGGAGCAAATGG	CTTGGATTACTGGGGACAAGGGACCTTTGTCACCGTCACCACA	AR	NMGANGL--	-----------
CY37	2	6(2)	1	10	10	GCACGG	GACAAGCAGA	ACTACTTCGATTACTGGGGACAAGGGACCTTTGTCACCGTCACCACA	AR	DKQN----	-----------

IGHJ2 — N A F F D Y W G Q G T L V T V T Q

Cl	IGHV	IGHD (rf)	Nb	CDR3 (aa)	D+N+P (bp)	IGHV	CDR3 junction	IGHJ2	IGHV	CDR3 (NAFFDY)	FR4 (WGQGTLVTVTQ)
CU40	6		1	11	7	GTTCGT	GAGTGCA	ACAATGCTTTCTTTGATTACTGGGGTCAGGGGACCCTAGTCACAGTCACACAA	VR	ECN------	-----------
CU20	6	3(2)	1	15	19	GCTCG**A**	**GCT**ATGGGGGCAGCTGGTT	ACAATGCTTTCTTTGATTACTGGGGTCAGGGGACCCTAGTCACAGTCACACAA	AR	AMGAAGY------	-----------
CU36	2	6(3)	1	13	13	GCACGG	GAGGTCTACAGCA	ACAATGCTTTCTTTGATTACTGGGGTCAGGGGACCCTAGTCACAGTCACACAA	AR	EVYSN------	-----------
CU46	4	1(3)	1	14	22	GCGAGG	GAGGACTGGGGTGGCACAGTGG	ATGCTTTCTTTGATTACTGGGGTCAGGGGACCCTAGTCACAGTCACACAA	AR	EDWGGTVD-----	-----------
CU78	9		1	11	7	GCGAGA	GATACAA	ACAATGCTTTCTTTGATTACTGGGGTCAGGGGACCCTAGTCACAGTCACACAA	AR	DTN------	-----------
CY13	5		2	11	8	GCCAGA	GATCTACT	CAATGCTTTCTTTGATTACTGGGGTCAGGGGACCCTAGTCACAGTCACACAA	AR	DLL------	-----------
CY17	2	6(3)	1	11	8	GCACGG	TCCTACAT	CAATGCTTTCTTTGATTACTGGGGTCAGGGGACCCTAGTCACAGTCACACAA	AR	SYI------	-----------
CY29	6		1	9	9	GCTCGA	GAGTACAGG	TCCTTTGATTACTGGGGTCAGGGGACCCTAGTCACAGTCACACAA	AR	EYRS---	-----------

IGHJ3 — Y N A F D Y W G Q G T L V T V T S

Cl	IGHV	IGHD (rf)	Nb	CDR3 (aa)	D+N+P (bp)	IGHV	CDR3 junction	IGHJ3	IGHV	CDR3 (YNAFDY)	FR4 (WGQGTLVTVTS)
CU3	8		1	10	5	GCAAGA	GAGGA	CTATAATGCTTTCGATTACTGGGGACAAGGCACCTTGGTGACAGTGACATCA	AR	ED------	-----------
CU23	2	2(2)	1	13	14	GCACGG	GACAGAGGGCAGTA	CTATAATGCTTTCGATTACTGGGGACAAGGCACCTTGGTGACAGTGACATCA	AR	DRGQY------	-----------
CU51	1		1	9	5	GCG**AGA**	**GCTCT**	TAATGCTTTCGATTACTGGGGACAAGGCACCTTGGTGACAGTGACATCA	AR	AL-----	-----------
CU95	6	3(1)	1	11	8	GCTCGA	TATGGGGG	CTATAATGCTTTCGATTACTGGGGACAAGGCACCTTGGTGACAGTGACATCA	AR	YGG------	-----------
CU8	1	1(1)	1	13	14	GCGAGA	CGAACTGGGCTGGC	CTATAATGCTTTCGATTACTGGGGACAAGGCACCTTGGTGACAGTGACATCA	AR	RTGLA------	-----------
CY18	3	5(1)	2	10	11	GCAAGA	GATCTGGGTGC	TGCTTTCGATTACTGGGGACAAGGCACCTTGGTGACAGTGACATCA	AR	DLGA----	-----------

IGHJ4 — Y G F D Y W G K G T W V E V T S

Cl	IGHV	IGHD (rf)	Nb	CDR3 (aa)	D+N+P (bp)	IGHV	CDR3 junction	IGHJ4	IGHV	CDR3 (YGFDY)	FR4 (WGKGTWVEVTS)
CU15	2	1(3)	1	13	20	GCACGG	GAGTGGGGTGGCACAGTGGC	TGGATTCGACTACTGGGGAAAAGGAACCTGGGTCGAAGTAACTTCA	AR	EWGGTVAGFDY	-----------
CU33	2	1i(6)	1	10	10	GCACGG	GACCGCAGAG	ATGGATTCGACTACTGGGGAAAAGGAACCTGGGTCGAAGTAACTTCA	AR	DRRD----	-----------
CU7	2		1	11	11	GCACGG	GAAACAGCTTA	TTATGGATTCGACTACTGGGGAAAAGGAACCTGGGTCGAAGTAACTTCA	AR	ETAY-----	-----------
CU28	4	2(1)	1	13	17	GGGAGA	GATGGGACGGGAGCAAG	TTATGGATTCGACTACTGGGGAAAAGGAACCTGGGTCGAAGTAACTTCA	GR	DGTGAS-----	-----------
CU18	1	2(1)	1	11	14	GCGAGA	GATAGGGGGAGCTC	TGGATTCGACTACTGGGGAAAAGGAACCTGGGTCGAAGTAACTTCA	AR	DRGSS----	-----------
CU31	1	2(1)	1	12	14	GCGAGA	GAGAGGGGAGCTTA	TTATGGATTCGACTACTGGGGAAAAGGAACCTGGGTCGAAGTAACTTCA	AR	ERGAY-----	-----------
CY19	3		2	9	5	GCAAGA	GATGC	TTATGGATTCGACTACTGGGGAAAAGGAACCTGGGTCGAAGTAACTTCA	AR	DA-----	-----------
CY35	1	2(2)	1	10	10	GCGAGA	GGGGAGAGG	TATGGATTCGACTACTGGGGAAAAGGAACCTGGGTCGAAGTAACTTCA	AR	GER-----	-----------

IGHJ5 — Y G A F D I W G P G T M V T V T S

Cl	IGHV	IGHD (rf)	Nb	CDR3 (aa)	D+N+P (bp)	IGHV	CDR3 junction	IGHJ5	IGHV	CDR3 (YGAFDI)	FR4 (WGPGTMVTVTS)
CY30	1	1(2)	16	15	21	GCGAGA	GTCGGACTGGGGTGGCACAGA	TATGGAGTTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	VGLGWHR--V---	-----------
CY4	1	1(2)	3	15	21	GCGAGA	GTCGGACTGGGGTGGCACAGA	TATGGAATTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	VGLGWHR--I---	-----------
CY51	1	1(2)	1	15	21	GCGAGA	GTCGGACTGGGGTGGCACAGA	TATGGAGCTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	VGLGWHR------	-----------
CY31	1	1(3)	1	14	18	GCGAGA	GAGGGCTGGGCTGGCCGG	TATGGAGCTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	EGWAGR------	-----------
CY12	3	1(2)	1	14	16	GCAAGA	GATCCGGGGTGGCACA	ACTATGGAACTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	DPGWHN--T---	-----------
CU11	2	3(2)	1	14	16	GCACGG	GACGCGATGGGGGTTT	ACTATGGAGCTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	DAMGVY------	-----------
CU37	6	6(1)	1	13	13	GCTCGG	CCTACAGCAGCCC	ACTATGGAGCTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	PTAAH------	-----------
CU12	1		1	8	3	GCGAGG	GAC	GGAGCTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	D-----	-----------
CU61	4	2(3)	1	10	8	GCGAGG	GATAAGGG	TGGAGCTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	DKG-----	-----------
CU14	2	1(1)	1	10	8	GCACGG	GCTGGGGT	TGGAGCTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	AGV-----	-----------
CU5	10		1	13	13	GCAAGA	GAAGAGAGATATT	ACTATGGAACTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	EERYY--T---	-----------
CU48	5	1(1)	1	14	24	GCCAGA	GACACTGGGGTGGCACAGTGGAGG	GCTTTTGATATTTGGGGGCCAGGGACCATGGTGACTGTCACTTCA	AR	DTGVAQWR----	-----------

IGHJ6 — W D F D Y W G K G T M V T V S A

Cl	IGHV	IGHD (rf)	Nb	CDR3 (aa)	D+N+P (bp)	IGHV	CDR3 junction	IGHJ6	IGHV	CDR3 (WDFDY)	FR4 (WGKGTMVTVSA)
CU17	2	4(3)	1	11	11	GCACGG	GATGGGAGCGT	CTGGGATTTCGACTACTGGGGAAAGGGAACCATGGTGACCGTCTCAGCT	AR	DGSV-----	-----------
CU47	2	4(2)	1	10	9	GCACG**A**	**T**GGGATAA	CTGGGATTTCGACTACTGGGGAAAGGGAACCATGGTGACCGTCTCAGCT	AR	WDN-----	-----------
CU32	2	6(3)	1	10	11	GCACGG	GACTACAGCA	GGGATTTCGACTACTGGGGAAAGGGAACCATGGTGACCGTCTCAGCT	AR	DYSR----	-----------

IGHJ7 — S S F D V W G K G V Q V T V T S

Cl	IGHV	IGHD (rf)	Nb	CDR3 (aa)	D+N+P (bp)	IGHV	CDR3 junction	IGHJ7	IGHV	CDR3 (SSFDV)	FR4 (WGKGVQVTVTS)
CU29	2	1(3)	1	11	10	GCACGG	GACTGGGGGC	GTAGCAGCTTCGATGTGTGGGGGAAAGGAGTCCAGGTCACCGTTACTTCA	AR	DWGR-----	-----------
CU6	1		1	10	7	GCGAGA	GACAT	AGGTAGCAGCTTCGATGTGTGGGGGAAAGGAGTCCAGGTCACCGTTACTTCA	AR	DIG-----	-----------

IGHJ8 — Y G L D Y W G Q G T V L T V T T

Cl	IGHV	IGHD (rf)	Nb	CDR3 (aa)	D+N+P (bp)	IGHV	CDR3 junction	IGHJ8	IGHV	CDR3 (YGLDY)	FR4 (WGQGTVLTVTT)
CU9	2		1	9	6	GCACGG	GACA	GATATGGCTTGGATTACTGGGGTCAAGGAACTGTTCTCACAGTCACAACA	AR	DR-----	-----------
CU25	1	4(1)	1	10	9	GCGAGA	GTGGGAGAT	TATGGCTTGGATTACTGGGGTCAAGGAACTGTTCTCACAGTCACGACA	AR	VGD-----	-----------

Fig. 2. Analysis of *P. waltl* CDR3 regions. Rearranged heavy chain sequences were obtained by 5′-RACE PCR performed on RNA extracted from a mixture of the spleens of two adult *P. waltl*. A) Nucleotide sequences grouped according to IGHJ identity. The 5′ end of IGHJ was determined by sharing identical nucleotides between sequences. Putative IGHD are underlined. Any junction having one stretch of at least six nucleotides identical to a portion of an IGHD core sequence was considered to use this segment. Potential P nucleotides are indicated in bold. IGHV subgroups and IGHD segments (within the used reading frame, rf) involved in each rearrangement are indicated on the left with the number of times a sequence was observed, the length of the CDR3 and the estimated number of nucleotides in junctional regions (D + N + P). There were no attempts to identify N regions due to the lack of genomic data for IGHJ and IGHD segments. B) Corresponding amino acid sequences. Dashes indicate amino acids identical to the IGHJ sequence. Note that this figure contains 51 sequences while Fig. 1 contains 36 sequences because some cDNAs have the same IGHV but different CDR3s. CDR3 and FR4 were defined according to IMGT.

BX649502)) and 6 VH found for the rainbow trout Oncorhynchus mykiss (IGHV3S1 (Acc no X81510), IGHV3S2 (Acc no L28742), IGHV3S3 (Acc no L28805), IGHV3S4 (Acc no Y08595), IGHV10S1 (Acc no X81508) and IGHV13S1 (Acc no DQ453153)). Only one such sequence could be found in mice (IGHV12-1-1 (Acc no AJ851868)), and none could be found for humans, cows (*Bos taurus*), sheep (Ovis aries), Arabian camels (*Camelus dromedarius*), llamas (Lama glama), chickens (*Gallus gallus*) and the African clawed frog (Xenopus laevis). These data suggest that this type of IGHV domain is restricted to teleost and urodele amphibians.

A stretch of three Cys in CDR1 (such as observed in the *P. waltl* IGHV6 subgroup) has been observed in the *A. mexicanum* IGHV8 subgroup (Golub and Charlemagne, 1998). Searches in the Ambystoma EST Database (http://salamander.uky.edu/ESTdb/) revealed that this triplet of cysteines was also present in CDR1 of two other *A. mexicanum* IGHV sequences (ID C301896 and C102107

at this web site) and one IGHV of *Ambystoma tirginum* (ID TC03826 at this web site). Searches in the IMGT (www.imgt.org/) and NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) databases did not reveal similar triplets in humans, mice, cows, sheep, Arabian camels, llamas, chickens, African clawed frogs, channel catfish, rainbow trout, zebrafish and nurse shark IGHV gene segments. Therefore, domains with a triplet of cysteines in CDR1 appear to be specific to urodele amphibians. These segments are highly related (Fig. 3), suggesting that the *P. waltl* IGHV6 CU21 and CU40 domains are the counterparts of the axolotl IGHV8 subgroup.

Given the presence of additional Cys residues in CDR1 and 2 of the *P. waltl* IGHV5 and IGHV6 domains, we hypothesized that a disulfide bridge could link the corresponding loops. To test this proposition, three-dimensional models of IGHV5 and IGHV6 domains were generated using a homology-based approach with the CPHmodel 3.2 (Nielsen et al., 2010) and ITasser (Zhang, 2008) software. The obtained models were highly homologous, with r.m.s.d. values ranging from 0.306 to 0.765 Å (129 Cα atoms) (Fig. 4A). The models are consistent with the presence of a disulfide bridge between Cys36 and Cys57 of the CU21 and CU95 sequences, Cys35 and Cys57 of CU20, and Cys34 and Cys57 of CU48 and CU85 (Fig. 4B). Interestingly, Cys57 is absent in CU40, but the models revealed the presence of a disulfide bridge between Cys34 and Cys35 that is similar to the disulfide bridge in CU20, CU21, CU48, CU85 and CU95 (Fig. 4C). In this case, the presence of a disulfide bridge between 2 consecutive amino acids may influence the conformation of the CDR1 loop (see blue CDR1 loop in Fig. 4A). Additionally, the models revealed that the other cysteines belonging to the triplet of Cys in CU40 and CU21 (note that such succession of free cysteines is rare) could perhaps allow a disulfide bond exchange, because the distance between the predicted disulfide bridge and free Cys is approximately 5–10 Å. As a consequence, structural arrangement of the antigen binding site could perhaps contribute to diversity. Finally, contrary to previous reports for NAR and camel Ig (Desmyter et al., 1996; Roux et al., 1998), our models did not predict a disulfide bridge between the Cys located in CDR1 and CDR3 of the CU40 sequence (Fig. 4D). Indeed, these amino acids are located too far apart from one another (from 9.2 to 12.5 Å).

Because additional disulfide bonds could rigidify the antigen-binding site and consequently affect antibody functionality, we investigated whether these urodele IGHV segments could significantly contribute to the expressed repertoire. Golub and Charlemagne (1998) observed 2 IGHV8 sequences with 3 Cys in CDR1 and one Cys in CDR2 amongst the 15 unique cDNAs isolated from their VHμ (composed of IgM heavy chains) *A. mexicanum* library. This represents a contribution of 13% to the IgM repertoire. Here, 2 VH domains with 3 Cys in CDR1 and one Cys in CDR2 were observed amongst the 22 unique *P. waltl* mu transcripts. This represents a contribution of 9% to the IgM repertoire, a percentage close to the one observed in *A. mexicanum*. Furthermore, the *P. waltl* IGHV5 and IGHV6 domains with one additional cysteine in CDR1 and 2 represent 23% of unique mu cDNA sequences and 14% of unique upsilon (IgY) cDNA sequences. Such segments were found in 20% of unique *A. mexicanum* upsilon cDNA sequences (Golub and Charlemagne, 1998). These data indicate that additional disulfide bonds do not seem to affect the expression of the IGHV gene segments.

3.2. Four of the 10 IGHV subgroups are used by P. waltl to build its Ig heavy chains

We previously showed that IgM is the most abundant isotype throughout the lifetime of *P. waltl* (Schaerlinger et al., 2008). Given this important role, we evaluated the contribution of the 10 IGHV subgroups to the repertoire of *P. waltl* mu transcripts. For this purpose, 96 clones containing a rearrangement associated with Cμ were randomly chosen from the library constructed using RNA extracted from the mixture of the spleens of two adult *P. waltl* and successively hybridized to probes specific for the 10 IGHV subgroups (Fig. 5A). We also built VH IgM libraries using RNA extracted from the spleens of two additional females of the same age that were randomly chosen in our animal facility. One hundred clones randomly chosen from each of these two libraries were analyzed by successive hybridization to the 10 IGHV subgroup-specific probes (Fig. 5B and C). Our results show that the usage of the 10 IGHV subgroups is quite similar in Fig. 5A and B. However, Fig. 5C shows lower expression of the IGHV2 subgroup in the last female that is compensated by increased expression of the IGHV1 and IGHV6 subgroups. Such variations were previously noted when the expression of the IGLV subgroups was analyzed in healthy humans (Ignatovich et al., 1997). Consequently, we took into account results obtained with this female to calculate the average contributions of the 10 IGHV subgroups to the *P. waltl* IgM heavy chains repertoire. Fig. 5D shows that on average the variable domains of the IgM heavy chains are mostly derived from gene segments of the IGHV1,

A)

```
                                FR1-IMGT          CDR1-IMGT       FR2-IMGT      CDR2-IMGT                FR3-IMGT                CDR3-IMGT
                                (1-26)            (27-38)         (39-55)       (56-65)                  (66-104)                (105-117)
                                _________________ __________ _______________ _________ ________________________________________ __
                                1       10        20        30        40        50        60        70        80        90        100
                                .........|.........|...... ...|........ .|.........|..... ....|..... ....|.........|.........|.........|.... ..
A. tigrinum                     QVTLLESGP.GVLKPSETLRLTCKVT GASLTDGCCC.. WDWIRQPPGKGLQWLGS ICYDGST... YYPESLK.SRVTVTRDTSRNEYSLQMSSARAEDTATFYC AR
P. waltl (clone CU21)           ---------.-TV------K------ -V----S---.. -N-N--------E---G -------... --SQ---.--L----E--IS-FY----NM---------- --
A. mexicanum (seq 1)            ---------.A-V------------ ------S---.. -N-T....--------R --SG---... N------.------------------------------ --
A. mexicanum (seq 2)            ---------.A-V------------ ----------.. -N--------------R --SG---... N------.------------------------------
A. mexicanum (seq 3)            ---------.--V----------R-- ------S---.. -S-----Q--------R --PA-N-... -------.------------------------------ --
```

B)

	A. tigrinum	*A. mexicanum* (seq 1)	*P. waltl*	*A. mexicanum* (seq 2)	*A. mexicanum* (seq 3)
A. tigrinum	–	86.9 %	75.8 %	89.9 %	90.9 %
A. mexicanum (seq 1)	–	–	80.8 %	90.9 %	87.9 %
P. waltl (clone CU21)	–	–	–	75.8 %	77.8 %
A. mexicanum (seq 2)	–	–	–	–	87.9 %

Fig. 3. IGHV regions with three additional cysteines in CDR1 and one additional cysteine in CDR2 that are specific to urodele amphibians. A) Alignment of *A. tigrinum*, *P. waltl* and *A. mexicanum* IGHV amino acid sequences. CDRs and FRs were defined according to IMGT. Amino acids identical to the *A. tigrinum* sequence are denoted by hyphens. Dots indicate gaps according to the IMGT unique numbering and spaces introduced to optimize similarity between sequences. The *A. tigrinum* sequence is from the Ambystoma EST Database (http://salamander.uky.edu/ESTdb/) (ID: TC03826, Tig-NM-175870-Contig-4). The accession number for the *P. waltl* sequence (clone CU21) is AJ575790. The accession number for *A. mexicanum* sequence 1 is AF027262. *A. mexicanum* sequences 2 and 3 are from the Ambystoma EST Database (ID: C102107 and C301896, respectively). Note that *A. mexicanum* sequence 2 is truncated in the C-terminus. B) Percentages of identical amino acids between sequences.

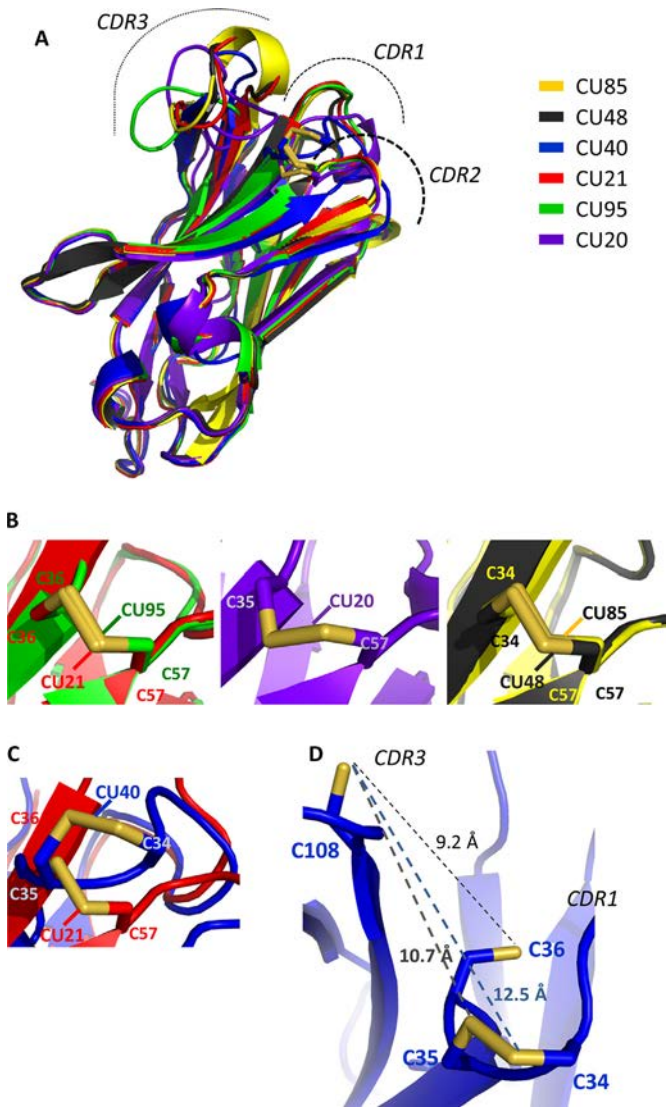


Fig. 4. Three-dimensional models of the *P. waltl* IGHV5 and IGHV6 domains obtained with the CPHmodel 3.2 software. A) Superimposition of IGHV5 and IGHV6 calculated models revealed highly homologous structures for CDR1 and 2 while CDR3 regions adopted several conformations. B) Predicted disulfide bridges between the CDR1 and CDR2 Cys of CU21, CU95, CU20, CU48 and CU85. C) Superimposition of the IGHV6 CU21 and CU40 structures revealing that in the absence of Cys57 in CU40, a putative disulfide bridge between Cys34 and Cys35 is formed that is structurally homologous to the disulfide bridge found in other sequences between CDR1 and 2. D) Distances between the triplet of Cys in CU40 CDR1 and Cys108 located in its CDR3.

IGHV2 and IGHV6 subgroups. Other subgroups had low (IGHV3, IGHV4 and IGHV5 subgroups) to very low (IGHV7, IGHV8, IGHV9 and IGHV10 subgroups) contributions.

Similar to IgA in mammals, IgY is the second most abundant isotype in unimmunized adult *P. waltl* (Schaerlinger et al., 2008). To evaluate the contribution of the 10 IGHV subgroups to this isotype, we built one VH IgY library using the RNA extracted from the mixture of the spleens of the two adult *P. waltl*. A total of 96 clones randomly chosen from this library were successively hybridized to our 10 IGHV probes (Fig. 5E). This analysis revealed that the IGHV1 subgroup mainly contributed to IgY heavy chain mRNAs. It was found in 71% of the analyzed clones, followed by the IGHV3 subgroup, which was observed in 19.5% of the clones. The other subgroups were rarely found (IGHV2, IGHV5 and IGHV6) or not observed (IGHV4, IGHV2, IGHV3, IGHV9 and IGHV10).

These results indicate that: i) IGHV6 gene segments characterized by additional Cys in CDR1 and CDR2 can be expressed by *P. waltl* confirming data deduced from clone sequencing (see end of section 3.1) and ii) that 4 out of the 10 existing IGHV subgroups were used by *P. waltl* to build its heavy chains. Such biases in the usage of IGHV subgroups were also observed in *A. mexicanum* and human heavy chains (Cook and Tomlinson, 1995; Golub and Charlemagne, 1998). Several hypotheses could explain these observations, such as the position of the IGHV gene segments in the locus and epigenetics. Indeed, the selection of gene segments for V(D)J recombination was shown to be governed by chromatin conformations (Ndifon et al., 2012), and epigenetic changes were demonstrated to control recombinase recruitment (Subrahmanyam et al., 2012). A second explanation could rely on structural criteria. For example, the IGHV5 subgroup, whose contribution to heavy chains mu and upsilon transcripts is low (Fig. 5), lacks Cys104, which is required to establish the conserved intra-domain disulfide bridge (Fig. 1). In contrast, *P. waltl* IGHV2 that are frequently used to generate mu transcripts (Fig. 5D) possess an FR3 region (the longest FR) similar to the one of human clan III. This clan comprises the large and frequently used human IGVH3 subgroup (Cook and Tomlinson, 1995). The structure of these IGHV3 gene segments may play a role in host immunity, thereby potentially providing an explanation for the conservation of their FR3 region. Finally, the integrity of the recombination signal sequence should be considered. For example, mutations in the first three nucleotides of its heptamer (consensus sequence CACAGTG) was shown to result in severely reduced joining rates during V(D)J recombination (Akamatsu et al., 1994). Given the importance of the IGHV1, IGHV2 and IGHV6 subgroups to the IgM repertoire of *P. waltl* (Fig. 5D), we analyzed the recombination signal sequences of germline IGHV1, IGHV2 and IGHV6 gene segments. One germline IGHV2 and two germline IGHV6 gene segments of *P. waltl* were previously isolated (Acc no FM877013, FM877014 and FM877015) (Bascove et al., 2009). Here, we isolated a germline IGHV1 gene segment (Acc n° KR812575). None of them presented recombination signals with mutations known to significantly affect V(D)J recombination.

3.3. In contrast to IGHV subgroups, IGHD and IGHJ are randomly used to create mu and upsilon transcripts

Alignment of rearrangements sequenced in this study allowed the identification of 8 IGHJ and 6 potential IGHD segments (Fig. 2 and Fig. S1).

P. waltl IGHJ possess the conserved amino acids present in many other vertebrate IGHJ (Phe115, Asp116, Trp118, Gly119, Gly121, Val124, Val126 and Thr127). In IGHJ6, Thr127 is replaced by serine, another small hydrophilic amino acid. In IGHJ8, Phe115 and Val124 are replaced by leucines. Leu and Val are both small hydrophobic amino acids, but Phe and Leu are very different because Phe is aromatic. As the five to six amino acids of CDR3 close to Trp118 were shown to be involved in VH–VL contacts (Padlan, 1994), this Phe to Leu change could perhaps impact the conformation of the antibody binding site.

The consensus sequences defining *P. waltl* IGHD are as follows: IGHD1 (ACTGGGGTGGCACA), IGHD2 (AGGGGAGC), IGHD3 (TATGGGGG), IGHD4 (ATGGGAGC), IGHD5 (CAACTGGGC) and IGHD6 (CCTACAGCAG). Note that only one base pair differs between IGHD2 and IGHD4, suggesting that they could be allelic variants. These six IGHD core sequences were found in 74% of the junctions. The portion of the junctional sequence thought to originate from these IGHD is underlined in Fig. 2. Note that other IGHD segments may exist because two junctions (in CU5 and CU7) are long.

Therefore, the *P. waltl* IGH locus is composed of at least 10 IGHV subgroups, eight IGHJ segments, six IGHD segments and three

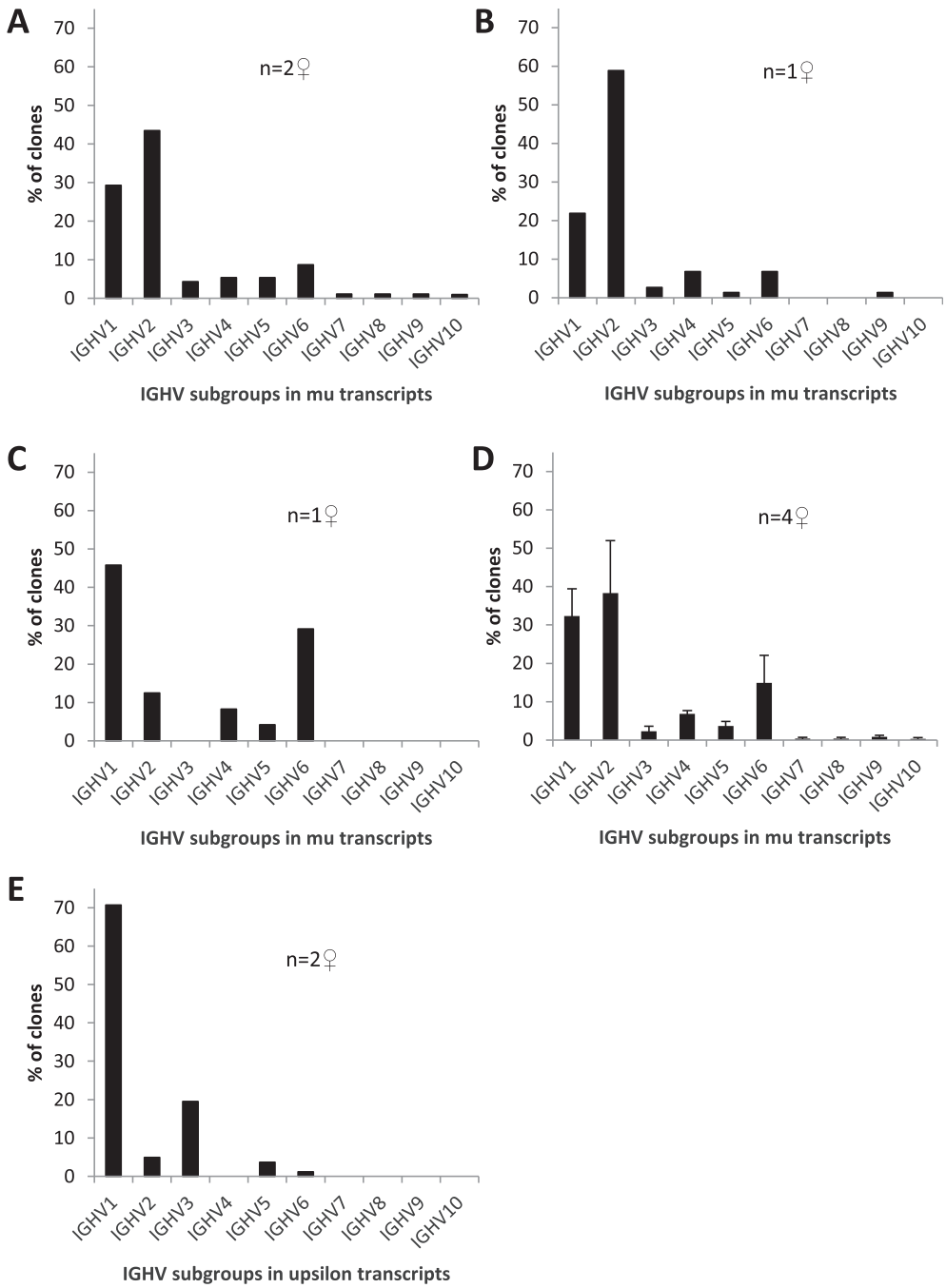


Fig. 5. Contribution of the 10 IGHV subgroups to *P. waltl* mu and upsilon transcripts. A) Values deduced from the analysis of 96 clones randomly chosen in the VH IgM library constructed from RNA extracted from the spleens of two adult female *P. waltl*. B and C) Expression of IGHV subgroups in the spleens of two other adult females of the same age (100 clones randomly chosen in each VH IgM library). D) Average of graphs A, B and C (means ± SEM). E) Contribution of the 10 IGHV subgroups to upsilon transcripts, as deduced from the analysis of 96 clones randomly chosen in the VH IgY library generated from RNA extracted from the spleens of two adult female *P. waltl*. To obtain these results, clones were successively hybridized to 10 IGHV subgroup-specific probes.

unique IGHC genes (IGHM, IGHY and IGHP) defining the previously described IgM, IgY and IgP classes (Schaerlinger et al., 2008). A similar composition of the IGH locus was observed in *A. mexicanum* and *Xenopus laevis*. The axolotl IGH locus contains 11 IGHV subgroups, nine IGHJ segments, at least four IGHD segments and three IGHC genes (IGHM, IGHY and IGHX) defining the mu, upsilon and xi chain isotypes and the IgM, IgY and IgX classes (Fellah and Charlemagne, 1988; Golub and Charlemagne, 1998; Patel and Hsu, 1997; Schaerlinger and Frippiat, 2008). The *Xenopus* IGH locus includes a large number of IGHV segments defining 11 subgroups, at least 10 IGHD, 8–9 IGHJ (Haire et al., 1990; Hsu et al., 1989; Schwager et al., 1991) and IGHC genes (IGHM, IGHD, IGHF, IGHY and IGHX) defining the mu, delta, phi, upsilon and xhi chains and the IgM, IgD, IgF, IgY and IgX classes (Haire et al., 1990; Mussmann et al., 1996; Ohta and Flajnik, 2006; Schwager et al., 1989; Warr et al., 1995; Zhao et al., 2006). Thus, the *P. waltl* IGH locus is very likely organized in a similar way in which many IGHV gene segments exist upstream of the IGHD, IGHJ and IGHC exons.

As in other species, *P. waltl* IGHD can be used in the reverse complement orientation (see the CU33 sequence in Fig. 2), the six

reading frames are coding (with the exception of IGHD6 that has only 5 open reading frames, Fig. S1) and some rearranged sequences lack an IGHD (the CU6, CU9, CU12, CU40, CU51, CU78, CY13 and CY19 sequences, Fig. 2), which is indicative of direct IGHV-IGHJ joining. Fig. 2 also indicates that IGHD1, IGHD3 and IGHD4 are used equally in their three direct reading frames (rf), while rf1 of IGHD2 and IGHD5 and rf2 and rf3 of IGHD6 are preferred. These different possibilities for using IGHD increase CDR3 diversity.

Table 1 indicates that in contrast to IGHV subgroups, IGHD and IGHJ segments seem to be randomly used to create mu transcripts. No preferential association was noted for this isotype. Interestingly, IGHJ segments also seem to be randomly used to create axolotl mu and upsilon mRNAs (Golub and Charlemagne, 1998). However, from Table 1 it appears that the IGHV1 subgroup associates preferentially with IGHD5 and IGHJ5 to create upsilon transcripts. This association has been observed 21 times, with the CY30 sequence observed 16 times and the CY4 sequence observed 3 times differing by a single nucleotide that induces a Val to Ile change at the 5′ end of IGHJ5 in CDR3 (Fig. 2). Thus, 19 out of the 21 IGHV1 subgroup-IGHD1-IGHJ5 sequences may be derived from the same clone. This result provides evidence for clonal expansion and does not seem to be an experimental artifact because mu and upsilon 5′-RACE PCRs were performed on the same RNA samples using the same experimental conditions and the same reagents. Furthermore, a clonal expansion was also observed when upsilon transcripts were amplified and cloned from the spleens of unimmunized axolotls (Golub and Charlemagne, 1998). Indeed, 14 clones out of 41 bore IGHV2 subgroup-IGHJ5 combinations with identical V–D–J junctions. Sequence alignments revealed that this rearrangement was different from the IGHV1 subgroup-IGHD1-IGHJ5 rearrangement observed here, because axolotl IGHV2 and *Pleurodeles* IGHV1 domains share only 33.7% amino acid identity. If this potential clonal expansion is not taken into account, no bias exists for the usage of *P. waltl* IGHD and IGHJ gene segments to create upsilon transcripts, as noted previously for *A. mexicanum*. We did not detect such clonal expansion when we analyzed splenic mouse IgA CDR3s (Table 2). The lack of sufficient *Xenopus* IgX and trout IgT heavy chain sequences in databases (the counterpart of IgA in these species) (Mussmann et al., 1996; Zhang et al., 2010) did not allow an analysis of CDR3s for these isotypes. In the future, it would be interesting to analyze the IgX and IgT repertoire in the spleens of these animals to determine whether such expansion is limited to urodeles. At present, the function of this expansion is unknown but it seems to be important because it was observed in two independent studies.

Note that no identical V–D–J rearrangement was observed amongst the 37 *P. waltl* splenic mu transcripts and that only one identical junction was found amongst 29 mu mRNA sequences from adult (2-year-old) *A. mexicanum* (Golub et al., 1997). Therefore, this clonal expansion is limited to the IgY isotype.

Taken together, these results indicate that IGHD and IGHJ usages are not restricted in mu or upsilon transcripts. Thus, these segments could create a significant level of combinatorial diversity in *P. waltl* mu and upsilon CDR3s.

3.4. Urodele antibody heavy chain diversity is concentrated in CDR3

Fig. 1 shows that *P. waltl* CDR1 and 2 are highly homologous within IGHV subgroups similar to the results obtained for *A. mexicanum* (Golub and Charlemagne, 1998). The exception is subgroup IGHV6, in which cDNAs likely derive from different IGHV gene segments (see below) thereby explaining the apparent diversity. In contrast, CDR3s are diverse (Figs. 2 and 4A). Based on the IMGT numbering system, CDR3 extends from position 105 (after the invariant Cys104) up to position 117 (just before, but not including, conserved Trp118 of IGHJ). Fifty-one out of the 77 analyzed sequences (66%) had different CDR3s: 37 sequences out of 39 (95%) for the mu isotype and 14 out of 38 (37%) for the upsilon isotype. CDR3 diversity is an important parameter because CDR3 encodes the longest and most central of the six loops that form the antibody binding site. Thus, it plays an important role in generating antibody binding site diversity. To better evaluate this diversity, we determined the junctional diversity (D + N + P, the sum of the

Table 1
Associations of IGHV, IGHD and IGHJ segments in *P. waltl* mu and upsilon transcripts.

IGHV–IGHJ associations in the VH IgM and VH IgY libraries

IGHV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IgM	J1 (1)[a] J3 (2) J4 (2) J5 (1) J7 (1) J8 (1)	J1 (1) J2 (1) J3 (1) J4 (3) J5 (2) J6 (3) J7 (1) J8 (1)		J2 (1) J4 (1) J5 (1)	J1 (2) J5 (1)	J1 (2) J2 (2) J3 (1) J5 (1)	J1 (1)	J3 (1)	J2 (1)	J5 (1)
IgY	J1 (1) J4 (1) J5 (21)	J1 (2) J2 (1)	J3 (2) J4 (2) J5 (1)		J2 (2)	J2 (1)				

IGHD-IGHJ associations in the VH IgM and VH IgY libraries

IGHJ	1	2	3	4	5	6	7	8
IgM	D2 (1)[a] D4 (1) D5 (2) D6 (3)	D1 (1) D3 (1) D6 (1)	D1 (1) D2 (1) D3 (1)	D1 (2) D2 (3)	D1 (2) D2 (1) D3 (1) D6 (1)	D4 (2) D6 (1)	D1 (1)	D4 (1)
IgY	D4 (1) D5 (1) D6 (1)	D6 (1)	D5 (2)	D2 (1)	D1 (22)			

[a] Numbers in brackets indicate the number of times an IGHV-IGHJ or IGHD-IGHJ association was observed in the libraries.

Table 2
Somatically generated diversity in CDR3 regions of mu and alpha/upsilon transcripts from different species.

Tissue	Isotype	D + N + P (bp)	CDR3 length in codons	CDR3 length in bp	R[a]	No. of sequences	References
P. waltl adult spleen (3-year-old)	IgM	12.1 ± 5.2	11.4 ± 1.8	34.1 ± 5.5	0.35 ± 0.10	37	This paper
A. mexicanum spleen, young (3.5-month-old)	IgM	8.4 ± 3.4*	10.4 ± 1.2	31.1 ± 3.4	0.27 ± 0.09*	40	Golub et al., 1997
A. mexicanum adult spleen (24-month-old)	IgM	10.8 ± 5.3	10.4 ± 2.1	31.1 ± 6.3	0.34 ± 0.13	30	Golub et al., 1997
A. mexicanum adult spleen (32-month-old)	IgM	10.7 ± 5.3	10.7 ± 1.6	32.1 ± 4.8	0.32 ± 0.13	82	Patel and Hsu, 1997
X. laevis tadpole spleen (stage 53–58)	IgM	10.4 ± 5.3	9.2 ± 2.13*	27.7 ± 6.4*	0.36 ± 0.14	25	Schwager et al., 1989
X. laevis adult spleen (5-month-old)	IgM	14.9 ± 5.7	11.2 ± 2.3	33.6 ± 7.0	0.43 ± 0.10*	27	Wilson et al., 1992
Mouse neonatal liver (1-day-old)	IgM	12.3 ± 5.2	10.2 ± 2.1	30.7 ± 6.3	0.39 ± 0.12*	129	Schelonka et al., 2010
Mouse adult spleen (60-day-old)	IgM	16.3 ± 6.6*	11.7 ± 2.9	35.0 ± 8.6	0.45 ± 0.12*	62	Prado et al., 2014
P. waltl adult spleen (3-year-old)	IgY	16.6 ± 5.9	13.2 ± 2.4	39.5 ± 7.3	0.41 ± 0.09	34	This paper
A. mexicanum adult spleen (24-month-old)	IgY	12.1 ± 5.1§	10.6 ± 1.5§	31.8 ± 4.4§	0.37 ± 0.11	30	Golub et al., 1997
Young mouse spleen (15-day-old)	IgA	9.3 ± 3.8§	9.6 ± 2.4§	28.9 ± 7.3§	0.34 ± 0.16	19	Prado et al., 2014
Adult mouse spleen (60-day-old)	IgA	14.2 ± 5.4	12.3 ± 1.8	36.9 ± 5.4	0.39 ± 0.15	13	Prado et al., 2014

*indicates statistically significant differences by comparison to *P. waltl* mu transcripts values. § indicates statistically significant differences by comparison to *P. waltl* upsilon transcripts values. Values are shown ± standard deviation.
[a] R is the ratio of D + N + P to CDR3 lengths expressed in base pairs.

IGHD, N and P nucleotides), the length of CDR3 and the ratio (R) between these two values to evaluate somatically generated diversity in each CDR3 (Fig. 2 and Table 2). The same calculations were made for mu, upsilon or alpha heavy chains of *A. mexicanum*, *X. laevis* and *M. musculus*. When possible, different developmental stages were considered.

As expected, Table 2 shows that *Xenopus* and murine CDR3 length and diversity (R values) increase during development. This result correlates with the appearance of the terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) during ontogeny that adds N-nucleotides at V–D and D–J junctions (Bogue et al., 1992; Lee and Hsu, 1994). These increases are not significant in axolotl IgM because Tdt and RAG have been shown to be expressed simultaneously during development (Golub et al., 2004).

In adult *P. waltl*, mu chain CDR3s are on average 11.4 ± 1.8 amino acids long, have a D + N + P value of 12.1 ± 5.2 base pairs and an R value of 0.35 ± 0.10. This CDR3 length is similar to the length observed for mu chains of *A. mexicanum* at the three considered ages, adult *X. laevis*, neonatal and adult *M. musculus*. Only the IgM CDR3 length of *Xenopus* tadpoles is statistically smaller. The average D + N + P value for *P. waltl* mu transcripts is similar to the one observed for mu transcripts of adult axolotl, *Xenopus* tadpoles, adult *Xenopus* and neonatal mouse. The D + N + P values in young axolotl and adult mice are statistically smaller and larger than the other values shown in Table 2, respectively. When the ratio R between these two values is calculated, the somatically generated diversity in *P. waltl* IgM CDR3s appears to be similar to the diversity observed in adult axolotl and *Xenopus* tadpoles. These data support previous observations suggesting that the diversity of the urodele mu repertoire could be similar to the diversity in *Xenopus* tadpoles (Lee and Hsu, 1994; Schwager et al., 1991).

Adult *P. waltl* CDR3s of upsilon transcripts are on average 13.2 ± 2.4 amino acids long, have a D + N + P value of 16.6 ± 5.9 base pairs and an R value of 0.41 ± 0.09. These CDR3 and D + N + P average lengths are as high as for adult mouse splenic IgA. Consequently, these two isotypes have very close R values. Interestingly, the R values determined for adult axolotl IgY and young mouse splenic IgA are not significantly different from those determined for IgY of adult *P. waltl* and IgA of adult *M. musculus*. This observation indicates that the diversity of alpha and upsilon CDR3s is similar in all species analyzed here, even if the CDR3 and D + N + P average lengths vary between species.

Thus, the diversity of adult *P. waltl* IgM heavy chain CDR3s is similar to the diversity observed in adult axolotl and anuran tadpoles, while the diversity of adult *P. waltl* upsilon heavy chain CDR3s is similar to the diversity observed in adult mouse alpha chains. Similarly, Patel and Hsu (1997) noted that junctional diversity in *A. mexicanum* IgM heavy chain CDR3s was lower than the diversity observed in newborn mice (29% of the axolotl CDR3s consisted of somatically generated sequences). From their data, the authors suggested that the axolotl antibody repertoire could be considerably smaller than the repertoire in mice or adult *Xenopus*. However, they did not study upsilon heavy chain CDR3s. Furthermore, we noted here that 95% of adult *P. waltl* mu cDNAs differed in their CDR3 region (against 29% in the axolotl). Together, these data suggest that diversity is not restricted in all urodeles species.

To deepen our understanding of antibody diversity in urodeles, we analyzed the amino acid composition of CDR3s from mu, alpha or upsilon chains in adult *P. waltl*, *A. mexicanum*, *X. laevis* and mice (Fig. 6). Tyrosine (ranging from 11 to 20% in mu and 9–26% in alpha/upsilon) and glycine (ranging from 12 to 26% in mu and 21.5–25% in alpha/upsilon) were highly frequent amino acids. These observations are in agreement with previous reports (Ivanov et al., 2005; Padlan, 1994). However, we noted that amphibian mu CDR3s contained 1.6–2.2 times more Gly than murine CDR3s. Glycine is associated with conformational flexibility. The occurrence of a higher number of glycines in amphibian IgM binding sites could therefore induces higher plasticity, as suggested by Golub et al. (1997), thereby allowing them to spatially adapt to many different epitopes. This flexibility could significantly improve binding (Padlan, 1994) and compensate for the lower urodele R values noted in Table 2. No statistically significant difference in Gly percentages was observed between urodele upsilon and mammalian alpha CDR3s.

Aromatic amino acids in CDRs (i.e., Tyr) are frequently found to be involved in the interaction with the antigen (Padlan, 1994). The strong decrease in Tyr frequencies in upsilon CDR3s of urodele amphibians (2.3–2.8-fold less Tyr than in mice) and the weaker frequency observed in mu CDR3s (1.6–1.8-fold less Tyr than in mice) also suggest that these antibodies could be more polyreactive. This hypothesis is supported by the following observations: i) polyreactive antibodies are usually encoded by unmutated or essentially unmutated germline gene segments (Logtenberg, 1990) as observed here (Fig. 1) and ii) Charlemagne's team often observed that the serum of unimmunized axolotls had significant titers of natural antibodies against bacterial and erythrocyte antigens (Golub et al., 1997).

Together, these data strongly suggest that urodele antibody

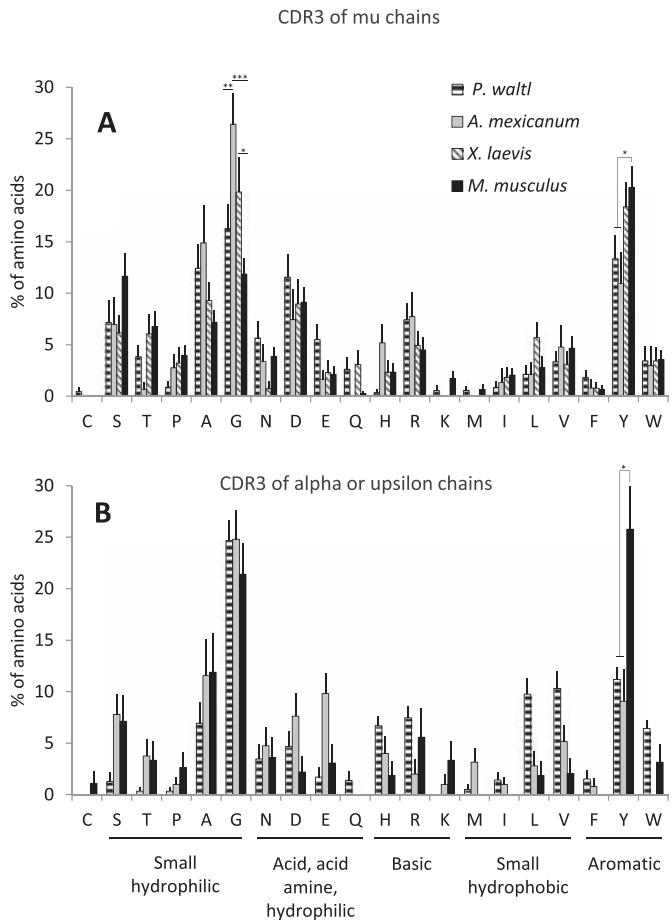


Fig. 6. Amino acid frequency in CDR3s of mu (A) and alpha (or its analog upsilon) heavy chains (B) in adults of various species (means ± SEM). Amino acids are classified according to their biochemical properties. For mu, n = 37 for *P. waltl*, n = 30 for *A. mexicanum*, n = 27 for *X. laevis* and n = 62 for mice. For upsilon/alpha, n = 34 for *P. waltl*, n = 30 for *A. mexicanum* and n = 13 for mice. Statistical analyses were only performed for the two predominant amino acids (Gly and Tyr). $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$.

diversity is not as low as previously thought because: *i*) CDR3 diversity in *P. waltl* upsilon heavy chains is as high as in mammalian alpha chains, ii) *P. waltl* IgM are multimeric molecules, and thus even low paratope affinity could lead to high avidity and iii) urodele amphibians produce three isotypes that most likely possess different effector functions. Finally, it should be noted that because IgY in urodeles is believed to be an IgA equivalent, the diversified repertoire of *P. waltl* upsilon heavy chains could perhaps be a steady state resulting for the host interaction with the gut microbiome.

3.5. Somatic hypermutation

Polyreactive antibodies provide an organism with the ability to cope with various antigens. A better defense is then achieved by affinity maturation. To evaluate the contribution of somatic hypermutation to mu and upsilon heavy chain diversity in *P. waltl*, cDNAs containing rearranged IGHV1, IGHV2 or IGHV6 gene segments were aligned with germline IGHV1, IGHV2 or IGHV6 sequences.

First, these alignments confirmed that the CU21 and CU40 cDNAs belonging to subgroup IGHV6 were very likely derived from a different IGHV gene segment than CU20, CU37 and CY29 based on important differences at the end of CDR1. In the same way, it is likely that the CU14 and CU36 cDNAs belonging to subgroup IGHV2 derived from an IGHV gene segment other than CU9, CU29, CY17 and CY37 due to the presence of 13 nucleotide differences. Suggestions for P nucleotide additions were also noted (bold in Fig. 2). These additions suggest that the Artemis protein exists in amphibians. Because no publication has described this protein in class Amphibia, we searched in various databases and identified partial Artemis-like proteins for *Xenopus tropicalis* (Acc no XP_002935298 found *via* the www.ncbi.nlm.nih.gov/website, 86% homology with murine Artemis) and *A. mexicanum* (ID C681774 found *via* the http://salamander.uky.edu/ESTdb/website, 71% homology with murine Artemis).

Importantly, these alignments revealed that the IGHV1 and IGHV2 domains of mu and upsilon cDNAs contained mutations that could correspond to somatic hypermutation (SHM) because they preferentially targeted C and G bases as reported in other ectotherms (Bascove et al., 2011; Hinds-Frey et al., 1993; Wilson et al., 1992; Yang et al., 2006). In contrast, our *Taq* polymerase mainly mutated A and T bases (Table 3). Although imprecise due to the limited number of sequences, the data presented in Table 3 show that SHM affects the V domains of both mu and upsilon isotypes. These mutations are not concentrated in CDR1 and 2 (data not shown) as previously reported for *X. laevis* (Wilson et al., 1992). This observation could be attributed to the lack of germinal centers in ectotherms, as shown by *in situ* hybridization experiments performed on *Xenopus* spleen sections (Marr et al., 2007). However, we believe that the C:G bias observed in ectotherms is unlikely to be due to a lack of selection because the pattern of mutations in passenger Ig transgenes, the heavy chain intron, non-Ig sequences placed within an Ig construct and unproductive rearranged Ig genes were not shown to display such bias (Betz et al., 1993; Dörner et al., 1997; González-Fernández et al., 1994; Yélamos et al., 1995). Furthermore, lymphotoxin-alpha-deficient mice, which do not form germinal centers, undergo SHM without a C:G bias (Matsumoto et al., 1996). Interestingly, the overexpression of full-length DNA polymerase mu (Polμ) in the RAMOS cell line increased the frequency of somatic hypermutation at C and G bases and decreased the frequency at A and T bases by a factor of six (Ruiz et al., 2004). Additionally, we previously estimated that full-length Polμ transcripts were 8–9 times more abundant in *P. waltl* than in humans and mice (Schenten et al., 2013). This overexpression of full-length Polμ could perhaps explain the G:C bias observed in *P. waltl* sequences and provide an explanation for the somatic hypermutation predilection for G and C bases in amphibians.

4. Conclusions and perspectives

In conclusion, we showed that the repertoire of *P. waltl* upsilon heavy chains is as diverse as the repertoire of mammalian alpha chains. The diversity of the *P. waltl* mu chains repertoire is similar to the one observed in anuran tadpoles and adult axolotls. However, antibody binding sites of both *P. waltl* upsilon and mu isotypes could be more polyreactive than in mammals, thereby possibly conferring Abs of this species with the ability to bind to a variety of antigens. We also noted that some *P. waltl* IGHV6 domains have a stretch of three cysteines in CDR1, a feature specific to urodele amphibians. Two additional cysteines (one in CDR1 and one in CDR2) are also present in IGHV5 and some IGHV6 domains which is a characteristic of urodeles and teleosts. Modeling suggests that these additional cysteines may allow the establishment of a disulfide bond between CDR1 and CDR2. An IgY clonal expansion in the spleen of adult *P. waltl* was observed that was similar to results from the spleens of unimmunized axolotls. The biological significance of this clonal expansion remains unknown, but it seems to be important because it was observed in different urodele species

Table 3
Number and nature of mutations in *P. waltl* IGHV1 and IGHV2 domains.[a]

	Number of sequenced nucleotides	Number and nature of the mutations
IgM IGHV1	1164	5 (2A:T + 3 G:C)
IgM IGHV2	1164	6 (1 A:T + 5 G:C)
IgY IGHV1	1746	12 (3 A:T + 9 G:C)
IgY IGHV2	582	5 (0 A:T + 5 G:C)
PCR errors	12154	12 (10 A:T + 2 G:C)

[a] To evaluate PCR errors, a plasmid containing a IGHV2-IGHD-IGHJ rearrangement was amplified by PCR using the conditions used for the construction of the VH IgM and IgY libraries. Resulting PCR products were cloned and sequenced.

analyzed by different teams. In the future, it would be interesting to analyze *P. waltl* light chains to investigate whether they also bear structural features specific to urodeles. Furthermore, it would be worthwhile to solve the crystallographic structure of a VH/VL pair to confirm the existence of additional disulfide bonds between CDR1 and 2 and to determine the exact consequences of these additional bonds on the paratope structure. It would also be interesting to reinvestigate *P. waltl* immunizations because previous works are dated. For example, it has long been thought that antibody diversity in fish is lower than the diversity generated in mammals; however, recent studies have suggested that this is not the case. Studies in zebrafish, Atlantic salmon and rainbow trout (Castro et al., 2013; Weinstein et al., 2009; Yasuike et al., 2010) suggested that the antibody repertoire in fish is equal to, or may even exceed, that of humans and mice. Similarly, when Kaattari et al. (2002) reinvestigated trout humoral response using a partition-based immunoassay they were able to detect a consistent increase in affinity within trout anti-TNP antisera.

Confilct of interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to R. Boxio for technical help. This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research, the French Space Agency (CNES) (contracts 4800000724 and 4800000786), the Université de Lorraine (UL) and the Région Lorraine. The funders had no role in the study design; collection, analysis and interpretation of data; preparation of the manuscript and decision to publish.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.08.006.

References

Akamatsu, Y., Tsurushita, N., Nagawa, F., Matsuoka, M., Okazaki, K., Imai, M., Sakano, H., 1994. Essential residues in V(D)J recombination signals. J. Immunol. Balt. Md 1950 (153), 4520–4529.
Almagro, J.C., Hernandez, I., del Carmen Ramirez, M., Vargas-Madrazo, E., 1997. The differences between the structural repertoires of VH germ-line gene segments of mice and humans: implication for the molecular mechanism of the immune response. Mol. Immunol. 34, 1199–1214.
Alzari, P.M., Spinelli, S., Mariuzza, R.A., Boulot, G., Poljak, R.J., Jarvis, J.M., Milstein, C., 1990. Three-dimensional structure determination of an anti-2-phenyloxazolone antibody: the role of somatic mutation and heavy/light chain pairing in the maturation of an immune response. EMBO J. 9, 3807–3814.
Amit, A.G., Mariuzza, R.A., Phillips, S.E., Poljak, R.J., 1986. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 A resolution. Science 233, 747–753.
Barré, S., Greenberg, A.S., Flajnik, M.F., Chothia, C., 1994. Structural conservation of hypervariable regions in immunoglobulins evolution. Nat. Struct. Biol. 1, 915–920.
Bascove, M., Frippiat, J.-P., 2010. Molecular characterization of *Pleurodeles waltl* activation-induced cytidine deaminase. Mol. Immunol. 47, 1640–1649. http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2010.01.005.
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. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 25, 2947–2955. http://dx.doi.org/10.1096/fj.11-185215.
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. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 23, 1607–1615. http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-121327.
Betz, A.G., Rada, C., Pannell, R., Milstein, C., Neuberger, M.S., 1993. Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 2385–2388.
Bogue, M., Gilfillan, S., Benoist, C., Mathis, D., 1992. Regulation of N-region diversity in antigen receptors through thymocyte differentiation and thymus ontogeny. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 11011–11015.
Boudarra, N., Frippiat, C., Dournon, C., Frippiat, J.-P., 2002. An alternative internal splicing site defines new ikaros isoforms in *Pleurodeles waltl*. Dev. Comp. Immunol. 26, 659–673.
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. Bethesda Md 1985 (98), 905–910. http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.00957.2004.
Brodeur, P.H., Riblet, R., 1984. The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse. I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. Eur. J. Immunol. 14, 922–930. http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830141012.
Castro, R., Jouneau, L., Pham, H.-P., Bouchez, O., Giudicelli, V., Lefranc, M.-P., Quillet, E., Benmansour, A., Cazals, F., Six, A., Fillatreau, S., Sunyer, O., Boudinot, P., 2013. Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection. PLoS Pathog. 9, e1003098. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003098.
Charlemagne, J., 1987. Antibody diversity in amphibians. Noninbred axolotls used the same unique heavy chain and a limited number of light chains for their anti-2,4-dinitrophenyl antibody responses. Eur. J. Immunol. 17, 421–424. http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830170319.
Charlemagne, J., 1979. Thymus independent anti-horse erythrocyte antibody response and suppressor T cells in the Mexican axolotl (Amphibia, Urodela, ambystoma mexicanum). Immunology 36, 643–648.
Charlemagne, J., Tournefier, A., 1977. Humoral response to Salmonella typhimurium antigens in normal and thymectomized urodele amphibian *Pleurodeles waltli* Michah. Eur. J. Immunol. 7, 500–502. http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830070719.
Ching, Y.C., Wedgwood, R.J., 1967. Immunologic responses in the axolotl, *Siredon mexicanum*. J. Immunol. Balt. Md 1950 (99), 191–200.
Chothia, C., Lesk, A.M., 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901–917.
Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davies, D., Tulip, W.R., 1989. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature 342, 877–883. http://dx.doi.org/10.1038/342877a0.
Cook, G.P., Tomlinson, I.M., 1995. The human immunoglobulin VH repertoire. Immunol. Today 16, 237–242. http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(95)80166-9.
Dard, P., Huck, S., Frippiat, J.P., Lefranc, G., Langaney, A., Lefranc, M.P., Sanchez-Mazas, A., 1997. The IGHG3 gene shows a structural polymorphism characterized by different hinge lengths: sequence of a new 2-exon hinge gene. Hum. Genet. 99, 138–141.
Desmyter, A., Transue, T.R., Ghahroudi, M.A., Thi, M.H., Poortmans, F., Hamers, R., Muyldermans, S., Wyns, L., 1996. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. Nat. Struct. Biol. 3, 803–811.
Dörner, T., Brezinschek, H.P., Brezinschek, R.I., Foster, S.J., Domiati-Saad, R., Lipsky, P.E., 1997. Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations within nonproductively rearranged human variable heavy chain genes. J. Immunol. Balt. Md 1950 (158), 2779–2789.
Fellah, J.S., Charlemagne, J., 1988. Characterization of an IgY-like low molecular weight immunoglobulin class in the *Mexican axolotl*. Mol. Immunol. 25, 1377–1386.
Fellah, J.S., Iscaki, S., Vaerman, J.P., Charlemagne, J., 1992. Transient developmental

expression of IgY and secretory component like protein in the gut of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Dev. Immunol. 2, 181–190.
Fellah, J.S., Jacques, C., Charlemagne, J., 1994a. Characterization of immunoglobulin heavy chain variable regions in the *Mexican axolotl*. Immunogenetics 39, 201–206.
Fellah, J.S., Kerfourn, F., Charlemagne, J., 1994b. Evolution of T cell receptor genes. Extensive diversity of V beta families in the *Mexican axolotl*. J. Immunol. Balt. Md 1950 (153), 4539–4545.
Frippiat, C., Kremarik, P., Ropars, A., Dournon, C., Frippiat, J.P., 2001. The recombination-activating gene 1 of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) is transcribed in lymphoid tissues and in the central nervous system. Immunogenetics 52, 264–275.
Gellert, M., 2002. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. Annu. Rev. Biochem. 71, 101–132. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.090501.150203.
Golub, R., André, S., Hassanin, A., Affaticati, P., Larijani, M., Fellah, J.S., 2004. Early expression of two TdT isoforms in the hematopoietic system of the *Mexican axolotl*. Implications for the evolutionary origin of the N-nucleotide addition. Immunogenetics 56, 204–213. http://dx.doi.org/10.1007/s00251-004-0681-2.
Golub, R., Charlemagne, J., 1998. Structure, diversity, and repertoire of VH families in the *Mexican axolotl*. J. Immunol. Balt. Md 1950 (160), 1233–1239.
Golub, R., Fellah, J.S., Charlemagne, J., 1997. Structure and diversity of the heavy chain VDJ junctions in the developing *Mexican axolotl*. Immunogenetics 46, 402–409.
González-Fernández, A., Gupta, S.K., Pannell, R., Neuberger, M.S., Milstein, C., 1994. Somatic mutation of immunoglobulin lambda chains: a segment of the major intron hypermutates as much as the complementarity-determining regions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 12614–12618.
Guéguinou, N., Huin-Schohn, C., Ouzren-Zarhloul, N., Ghislin, S., Frippiat, J.-P., 2014. Molecular cloning and expression analysis of *Pleurodeles waltl* complement component C3 under normal physiological conditions and environmental stresses. Dev. Comp. Immunol. 46, 180–185. http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.011.
Haire, R.N., Amemiya, C.T., Suzuki, D., Litman, G.W., 1990. Eleven distinct VH gene families and additional patterns of sequence variation suggest a high degree of immunoglobulin gene complexity in a lower vertebrate, *Xenopus laevis*. J. Exp. Med. 171, 1721–1737.
Hinds-Frey, K.R., Nishikata, H., Litman, R.T., Litman, G.W., 1993. Somatic variation precedes extensive diversification of germline sequences and combinatorial joining in the evolution of immunoglobulin heavy chain diversity. J. Exp. Med. 178, 815–824.
Hoegg, S., Vences, M., Brinkmann, H., Meyer, A., 2004. Phylogeny and comparative substitution rates of frogs inferred from sequences of three nuclear genes. Mol. Biol. Evol. 21, 1188–1200. http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msh081.
Houdayer, M., Fougereau, M., 1972. Phylogeny of immunoglobulins: immune reaction of the *axolotl*, *Ambystoma mexicanum*. Kinetics of the immune response and characterization of antibodies. Ann. Inst. Pasteur. 123, 3–28.
Hsu, E., Schwager, J., Alt, F.W., 1989. Evolution of immunoglobulin genes: VH families in the amphibian *Xenopus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 8010–8014.
Ignatovich, O., Tomlinson, I.M., Jones, P.T., Winter, G., 1997. The creation of diversity in the human immunoglobulin V(lambda) repertoire. J. Mol. Biol. 268, 69–77. http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1997.0956.
Ivanov, I.I., Schelonka, R.L., Zhuang, Y., Gartland, G.L., Zemlin, M., Schroeder, H.W., 2005. Development of the expressed Ig CDR-H3 repertoire is marked by focusing of constraints in length, amino acid use, and charge that are first established in early B cell progenitors. J. Immunol. Balt. Md 1950 (174), 7773–7780.
Kaattari, S.L., Zhang, H.L., Khor, I.W., Kaattari, I.M., Shapiro, D.A., 2002. Affinity maturation in trout: clonal dominance of high affinity antibodies late in the immune response. Dev. Comp. Immunol. 26, 191–200.
Kaufman, J., Völk, H., Wallny, H.J., 1995. A "minimal essential Mhc" and an "unrecognized Mhc": two extremes in selection for polymorphism. Immunol. Rev. 143, 63–88.
Lee, A., Hsu, E., 1994. Isolation and characterization of the *Xenopus* terminal deoxynucleotidyl transferase. J. Immunol. Balt. Md 1950 (152), 4500–4507.
Logtenberg, T., 1990. Properties of polyreactive natural antibodies to self and foreign antigens. J. Clin. Immunol. 10, 137–140.
Marr, S., Morales, H., Bottaro, A., Cooper, M., Flajnik, M., Robert, J., 2007. Localization and differential expression of activation-induced cytidine deaminase in the amphibian *Xenopus* upon antigen stimulation and during early development. J. Immunol. Balt. Md 1950 (179), 6783–6789.
Matsumoto, M., Lo, S.F., Carruthers, C.J., Min, J., Mariathasan, S., Huang, G., Plas, D.R., Martin, S.M., Geha, R.S., Nahm, M.H., Chaplin, D.D., 1996. Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. Nature 382, 462–466. http://dx.doi.org/10.1038/382462a0.
Mussmann, R., Du Pasquier, L., Hsu, E., 1996. Is *Xenopus* IgX an analog of IgA? Eur. J. Immunol. 26, 2823–2830. http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830261205.
Ndifon, W., Gal, H., Shifrut, E., Aharoni, R., Yissachar, N., Waysbort, N., Reich-Zeliger, S., Arnon, R., Friedman, N., 2012. Chromatin conformation governs T-cell receptor Jβ gene segment usage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 15865–15870. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1203916109.
Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L., Muyldermans, S., 2000. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. EMBO J. 19, 921–930. http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.5.921.
Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O., Petersen, T.N., 2010. CPHmodels-3.0–remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. Nucleic Acids Res. 38, W576–W581. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq535.
Ohta, Y., Flajnik, M., 2006. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 10723–10728. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0601407103.
Padlan, E.A., 1994. Anatomy of the antibody molecule. Mol. Immunol. 31, 169–217.
Patel, H.M., Hsu, E., 1997. Abbreviated junctional sequences impoverish antibody diversity in urodele amphibians. J. Immunol. Balt. Md 1950 (159), 3391–3399.
Pei, J., Kim, B.-H., Grishin, N.V., 2008. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. Nucleic Acids Res. 36, 2295–2300. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn072.
Prado, C., Rodríguez, M., Cortegano, I., Ruiz, C., Alía, M., de Andrés, B., Gaspar, M.L., 2014. Postnatal and adult immunoglobulin repertoires of innate-like CD19(+) CD45R(lo) B Cells. J Innate Immun. 6, 499–514. http://dx.doi.org/10.1159/000358237.
Ropars, A., Bautz, A.-M., Dournon, C., 2002. Sequencing and expression of the CD3 gamma/delta mRNA in Pleurodeles waltl (urodele amphibian). Immunogenetics 54, 130–138. http://dx.doi.org/10.1007/s00251-002-0437-9.
Roux, K.H., Greenberg, A.S., Greene, L., Strelets, L., Avila, D., McKinney, E.C., Flajnik, M.F., 1998. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 11804–11809.
Ruiz, J.F., Lucas, D., García-Palomero, E., Saez, A.I., González, M.A., Piris, M.A., Bernad, A., Blanco, L., 2004. Overexpression of human DNA polymerase mu (Pol mu) in a Burkitt's lymphoma cell line affects the somatic hypermutation rate. Nucleic Acids Res. 32, 5861–5873. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh929.
Salvadori, F., Tournefier, A., 1996. Activation by mitogens and superantigens of axolotl lymphocytes: functional characterization and ontogenic study. Immunology 88, 586–592.
Sammut, B., Laurens, V., Tournefier, A., 1997. Isolation of Mhc class I cDNAs from the axolotl *Ambystoma mexicanum*. Immunogenetics 45, 285–294.
Schaerlinger, B., Bascove, M., Frippiat, J.-P., 2008. A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. Mol. Immunol. 45, 776–786. http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.356.
Schaerlinger, B., Frippiat, J.-P., 2008. IgX antibodies in the urodele amphibian *Ambystoma mexicanum*. Dev. Comp. Immunol. 32, 908–915. http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2008.01.001.
Schelonka, R.L., Szymanska, E., Vale, A.M., Zhuang, Y., Gartland, G.L., Schroeder Jr., H.W., 2010. DH and JH usage in murine fetal liver mirrors that of human fetal liver. Immunogenetics 62, 653–666. http://dx.doi.org/10.1007/s00251-010-0469-5.
Schenten, V., Guéguinou, N., Baatout, S., Frippiat, J.-P., 2013. Modulation of *Pleurodeles waltl* DNA polymerase mu expression by extreme conditions encountered during spaceflight. PloS One 8, e69647. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069647.
Schwager, J., Bürckert, N., Courtet, M., Du Pasquier, L., 1991. The ontogeny of diversification at the immunoglobulin heavy chain locus in *Xenopus*. EMBO J. 10, 2461–2470.
Schwager, J., Bürckert, N., Courtet, M., Du Pasquier, L., 1989. Genetic basis of the antibody repertoire in *Xenopus*: analysis of the Vh diversity. EMBO J. 8, 2989–3001.
Subrahmanyam, R., Du, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Ji, Y., Zhang, Y., Alt, F.W., Schatz, D.G., Sen, R., 2012. Localized epigenetic changes induced by DH recombination restricts recombinase to DJH junctions. Nat. Immunol. 13, 1205–1212. http://dx.doi.org/10.1038/ni.2447.
Tournefier, A., 1975. Incomplete antibodies and immunoglobulin characterization in adult urodeles, *Pleurodeles waltl* Michah. and *Triturus alpestris* Laur. Immunology 29, 209–217.
Tournefier, A., Charlemagne, J., 1975. Antibodies against *Salmonella* and SRBC in urodele amphibians: synthesis and characterization. Adv. Exp. Med. Biol. 64, 161–171.
Tournefier, A., Laurens, V., Chapusot, C., Ducoroy, P., Padros, M.R., Salvadori, F., Sammut, B., 1998. Structure of MHC class I and class II cDNAs and possible immunodeficiency linked to class II expression in the *Mexican axolotl*. Immunol. Rev. 166, 259–277.
Tramontano, A., Chothia, C., Lesk, A.M., 1990. Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the VH domains of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 215, 175–182. http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80102-0.
Völk, H., Charlemagne, J., Tournefier, A., Ferrone, S., Jost, R., Parisot, R., Kaufman, J., 1998. Wide tissue distribution of *axolotl* class II molecules occurs independently of thyroxin. Immunogenetics 47, 339–349.
Warr, G.W., Magor, K.E., Higgins, D.A., 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunol. Today 16, 392–398. http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5.
Weinstein, J.A., Jiang, N., White, R.A., Fisher, D.S., Quake, S.R., 2009. High-throughput sequencing of the zebrafish antibody repertoire. Science 324, 807–810. http://dx.doi.org/10.1126/science.1170020.
Wilson, M., Hsu, E., Marcuz, A., Courtet, M., Du Pasquier, L., Steinberg, C., 1992. What limits affinity maturation of antibodies in *Xenopus*–the rate of somatic mutation or the ability to select mutants? EMBO J. 11, 4337–4347.
Yang, F., Waldbieser, G.C., Lobb, C.J., 2006. The nucleotide targets of somatic mutation and the role of selection in immunoglobulin heavy chains of a teleost

fish. J. Immunol. Balt. Md 1950 (176), 1655–1667.
Yasuike, M., de Boer, J., von Schalburg, K.R., Cooper, G.A., McKinnel, L., Messmer, A., So, S., Davidson, W.S., Koop, B.F., 2010. Evolution of duplicated IgH loci in *Atlantic salmon*, *Salmo salar*. BMC Genomics 11, 486. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-486.
Yélamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y.L., González Fernández, A., Pannell, R., Neuberger, M.S., Milstein, C., 1995. Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. Nature 376, 225–229. http://dx.doi.org/10.1038/376225a0.
Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinforma. 9, 40. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-40.
Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S.E., Bartholomew, J., Sunyer, J.O., 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. Nat. Immunol. 11, 827–835. http://dx.doi.org/10.1038/ni.1913.
Zhao, Y., Pan-Hammarström, Q., Yu, S., Wertz, N., Zhang, X., Li, N., Butler, J.E., Hammarström, L., 2006. Identification of IgF, a hinge-region-containing Ig class, and IgD in *Xenopus tropicalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 12087–12092. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0600291103.

CHAPITRE III : EFFETS DE STRESS CHRONIQUES SOCIO-ENVIRONNEMENTAUX IMPREVISIBLES SUR LA LYMPHOPOÏESE T ET LE REPERTOIRE TCRβ MURIN

	Matin (1heure)	Après-midi (2 heures)	Nuit 18h00 à 9h00
Lundi	Confinement	Inclinaison de la cage	Accès difficile à la nourriture
Mardi	Confinement	Cohabitation	Eclairement nocturne
Mercredi	Inclinaison de la cage	Confinement	Litière humide
Jeudi	Confinement	Cohabitation	Inclinaison de la cage
Vendredi	Confinement	Inclinaison de la cage	
Week-end	Cycle inversé		

Tableau 5: Protocole hebdomadaire d'exposition aux stress socio-environnementaux (modèle CUMS)

Le modèle CUMS a été mis au point par l'équipe INSERM UMR894 de Paris. Les animaux soumis au protocole CUMS subissent quotidiennement différents stress socio-environnementaux tels que le confinement dans de petites cages (11 x 8 x 8 cm), l'inclinaison de la cage d'environ 30°, la cohabitation avec des animaux d'autres cages ou encore l'inversement du cycle jour/nuit durant tout le week-end.

1- INTRODUCTION

Les vols spatiaux soumettent les astronautes à de nombreux stress qui affectent notamment le système immunitaire (Frippiat et al. 2016; Guéguinou et al. 2009), dont la lymphopoïèse T, les rendant plus vulnérables aux infections (S. K. Mehta et al. 2014; G. R. Taylor et al. 1997) et à la survenue d'autres pathologies telles que le cancer (Barcellos-Hoff et al. 2015) ou les maladies cardio-vasculaires (Delp et al. 2016). Afin de développer des contre-mesures pour maintenir une efficacité suffisante du système immunitaire lors de vols longs, il est important de comprendre comment ces facteurs de stress impactent les cellules immunitaires.

Plusieurs études ont mis en évidence l'impact de stress gravitaires sur le développement des cellules T (Ghislin et al. 2015; Woods et al. 2003). En revanche, aucune étude n'existe, à notre connaissance, sur l'effet des facteurs socio-environnementaux rencontrés en vol sur la lymphopoïèse T. Un des objectifs de ma thèse a donc été de répondre en partie à cette question. Pour cela, nous avons choisi d'exposer des souris gestantes à des stress chroniques aléatoires (ou CUMS pour « Chronic Unpredictable Mild Socio-environmental Stressors ») (Tableau 5) pour ensuite analyser le répertoire de chaînes TCRβ de leurs souriceaux. Ce modèle induit des modifications immunologiques similaires à celles observées chez les astronautes après une mission spatiale (Gaignier et al. 2018). Dans cette étude, nous avons choisi de travailler sur des souriceaux nouveau-nés afin de garantir que les effets observés sur le développement des LT soient uniquement dus à l'exposition au modèle CUMS.

2- RESULTATS ET DISCUSSION

2.1- Effets du modèle CUMS sur l'état de stress des souriceaux et sur la lymphopoïèse T

Nous avons pu montrer que le CUMS n'induit pas d'augmentation du niveau de stress chez les souriceaux nouveau-nés (Figure 1 publication 2). De plus, sur le plan cellulaire, la lymphopoïèse T (analysée par cytométrie en flux) n'est pas modifiée chez les souriceaux CUMS par rapport aux souriceaux contrôles (Tableau 2 publication 2). Au cours de cette analyse nous

avons également évalué l'expression du TCR à la surface des cellules et n'avons pas observé de différences significatives (Tableau 3 publication 2).

2.2- Impacts du modèle CUMS sur le répertoire TCRβ des souriceaux

Cette absence d'effet sur le plan cellulaire, n'excluant pas un impact potentiel sur le répertoire de TCR, nous avons décidé d'étudier de façon détaillée le répertoire de chaînes β du TCR. Dans ce but, des banques d'ADNc codant pour les chaînes TCR β ont été constituées et séquencées par séquençage haut-débit MiSeq. Sachant que la réponse au stress est différente selon les sexes (Verma, Balhara, and Gupta 2011; Kudwa, McGivern, and Handa 2014; Bereshchenko, Bruscoli, and Riccardi 2018), nous avons analysé séparément les souriceaux mâles et femelles. Afin d'avoir une vision globale des variations existantes pour chaque paramètre nous avons défini un indice de dissimilarité permettant d'évaluer les différences entre les groupes CUMS et contrôles ou les groupes mâles et femelles. Nous avons pu définir l'existence d'un répertoire majeur, constitué de 3 segments Vβ et représentant 75% du répertoire global, et d'un répertoire mineur, constitué de 22 segments Vβ et représentant 25% du répertoire global (Figure 2A publication 2). De façon intéressante, nous avons montré que le répertoire majeur est stable quel que soit les comparaisons, tandis que le répertoire mineur varie en condition de stress et selon les genres (Figure 2B publication 2). La stabilité du répertoire majeur suggère que celui-ci est essentiel à l'immunité des souriceaux nouveau-nés. Différents facteurs peuvent expliquer la variation des segments Vβ au sein du répertoire mineur. En effet, il a été montré que le choix de ces segments est dépendant de l'âge des animaux (Sethna et al. 2017) ce qui peut s'expliquer par des différences de sélections thymiques qui ont été observées entre des souris jeunes et âgées (Dong et al. 2017). Il a également été montré que le choix des segments peut être régulé par des modifications du remodelage de la chromatine durant la recombinaison V(D)J (C.-R. Xu et al. 2008; Ndifon et al. 2012) qui contrôlent également le recrutement des protéines RAG au niveau des segments à recombiner (Liu et al. 2007; Subrahmanyam et al. 2012).

En ce qui concerne les segments Jβ et D, l'analyse des indices de dissimilarité n'a pas mis en évidence de différence dans leur utilisation (Figure 2D et 2F publication 2). Nous avons cependant constaté que les segments Jβ appartenant au sous-groupe 2 sont plus

fréquemment utilisés que ceux appartenant au sous-groupe 1 (Figure 2C publication 2) et que le segment D1 est plus utilisé que D2 (Figure 2E publication 2). Cette observation a également été faite chez des souris adultes (Freeman et al. 2009; Ndifon et al. 2012), suggérant que certaines particularités du répertoire TCRβ sont fixées dès la naissance.

Enfin, nous avons analysé les indices de dissimilarité des associations Vβ-Jβ dans le répertoire mineur et majeur des différents groupes de souriceaux (Figure 3 de la publication 2). La comparaison des indices des deux répertoires entre eux montre que le répertoire mineur varie plus que le répertoire majeur. Nous n'avons pas observée de variation des associations dans le répertoire majeur, tandis que, dans le répertoire mineur, les associations Vβ-Jβ varie significativement entre les groupes contrôles et CUMS mais pas entre les mâles et les femelles par rapport au seuil de référence de 5%. Ces résultats confirment que le répertoire majeur n'est pas dépendant du genre et n'est pas affecté par l'exposition au CUMS contrairement au répertoire mineur qui semble être plus sensible à ces facteurs de stress socio-environnementaux.

Pris ensemble, ces résultats montrent qu'une partie du répertoire TCRβ (25 %) est affectée par les facteurs de stress socio-environnementaux. Or, nous avons précédemment montré que 85% du répertoire TCRβ sont affectés par l'exposition à l'hypergravité durant la gestation (Ghislin et al. 2015). Il semble donc que les facteurs socio-environnementaux impactent plus faiblement le répertoire TCRβ.

2.3- Effets du modèle CUMS sur les effecteurs de la recombinaison V(D)J

Les protéines RAG, Artemis et TdT sont trois facteurs indispensables au processus de recombinaison V(D)J. Etant donné que l'exposition au CUMS induit des modifications de l'utilisation des segments Vβ appartenant au répertoire mineur, nous nous sommes demandés si ces modifications étaient liées à des perturbations de l'activité de ces trois effecteurs. Pour répondre à cette question, nous avons étudié les signatures laissées par ces différents facteurs : nombre de nucléotides (nt) manquants au niveau des extrémités des segments Vβ, D et Jβ pour RAG, nombre de nt palindromiques ajoutés par Artémis et nombre de nt non génomiques ajoutés pour la TdT.

Dans le cas de RAG, nous avons pu mettre en évidence un profil de coupure conservé entre toutes les conditions dans le nombre de nt manquants aux extrémités 3'V et 5'J (Figure 4A et 4C publication 2) ainsi que pour la longueur des segments D (Figure 4E). L'analyse des indices de dissimilarité n'a pas mis en évidence de modification de ce profil (Figure 4B, 4D et 4F publication 2).

Dans le cas d'Artémis et de la TdT, nous avons observé que 93% des séquences ne possèdent pas de nt palindromiques (Figure 5A publication 2) et 27 % ne possèdent pas de nt non génomiques au niveau des jonctions VD et DJ (Figure 5C publication 2). L'analyse des indices de dissimilarité a révélé que l'ajout de ces nt palindromiques ou non génomiques au niveau des jonctions n'est pas affecté par l'exposition au CUMS ou par le genre (Figure 5B et 5D publication 2).

Pris ensemble, ces résultats indiquent que les activités des protéines RAG, Artémis et TdT, et donc le processus de recombinaison V(D)J, ne sont probablement pas affectés par l'exposition au CUMS durant la gestation et ne peuvent pas expliquer les différences d'utilisation de segments Vβ observées au sein du répertoire mineur.

2.4- Impacts potentiels des modifications du répertoire mineur sur l'immunité de l'hôte

Nous nous sommes finalement demandés quel pourrait être l'impact des modifications du répertoire mineur sur l'immunité de l'hôte. Pour répondre à cette question, nous avons comparé nos séquences de CDR3 de souriceaux avec d'autres séquences de CDR3 connues pour avoir des propriétés autoréactives ou pour être impliquées dans d'autres réactions immunitaires (réponse à des agents pathogènes, réaction aux allogreffes ou aux cellules T liées à une tumeur) (Figure 6B et 6D publication 2). Ainsi, nous avons montré que les CDR3 issus du répertoire mineur des souriceaux CUMS et des souriceaux femelles pourraient être plus autoréactifs que ceux des souriceaux contrôles et des souriceaux mâles respectivement (Figure 6A et 6C publication 2). En accord avec cette observation, une précédente étude a montré que le répertoire TCR de souriceaux nouveau-nés est plus autoréactif que celui de souris plus âgées. Ceci serait dû à une diminution du seuil des sélections thymiques chez les souriceaux nouveau-nés (Dong et al. 2017). Il a aussi été suggéré que cette autoréactivité des

récepteurs T pourrait leur conférer la capacité de reconnaître un grand nombre de peptides antigéniques différents (Wooldridge et al. 2012). En effet, la majorité des résidus est impliquée dans la structure conformationnelle du TCR qui peut être plus ou moins flexible selon la constitution de sa séquence en acides aminés et peut influencer la capacité à reconnaître un grand nombre de peptides différents (Su and Davis 2013). Or, l'analyse des séquences en acides aminés des CDR3 des souriceaux témoins et CUMS montre une forte représentation des résidus glycines qui sont associés à la flexibilité et à la plasticité conformationnelle des régions impliquées dans le site de reconnaissance antigénique (Figure 7 publication 2). Ces résultats suggèrent donc que le répertoire TCRβ des souriceaux, à la naissance, est probablement constitué de CDR3 polyréactifs.

3- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons montré que le répertoire TCRβ est modifié, bien que le modèle CUMS appliqué à des femelles gestantes n'impacte pas la lymphopoïèse T des souriceaux. Ces modifications pourraient induire une autoréactivité, et probablement une polyréactivité, plus importante. Ainsi les capacités de défense des souriceaux face à un agent pathogène seraient modifiées.

Etant donné que les missions spatiales futures seront de plus longue durée, il serait intéressant d'étudier le répertoire TCRβ chez ces souriceaux dont l'exposition au CUMS serait prolongée jusqu'à l'âge adulte. De plus, ces souris pourraient être immunisées pour déterminer leur capacité de réponse à des agents pathogènes. D'autre part, il serait intéressant d'étudier à l'âge adulte le répertoire TCR des souriceaux nés de mères soumises au modèle CUMS durant la gestation, mais non soumis à ces stress après la naissance, afin de voir si certaines caractéristiques du répertoire TCR liées au stress sont conservées à l'âge adulte.

De façon intéressante, les résultats de cette étude vont bien au-delà du domaine du spatial puisqu'il est établi que ce modèle peut être utilisé pour mimer les stress rencontrés lors de la vie quotidienne. Ainsi, d'une manière plus générale, ces résultats suggèrent que le stress rencontré lors de la gestation impacte le répertoire de la descendance et donc probablement, sa capacité de défense face à un agent pathogène.

PUBLICATION 2 : Les facteurs de stress socio-environnementaux rencontrés lors des vols spatiaux affectent partiellement le répertoire TCR-β murin et augmentent son autoréactivité

Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR-β repertoire and increase its self-reactivity

Coralie Fonte,* Sandra Kaminski,* Anne Vanet,† Laurence Lanfumey,‡ Charles Cohen-Salmon,§ Stéphanie Ghislin,*,1 and Jean-Pol Frippiat*,1,2

*Stress Immunity Pathogens Laboratory, EA7300, Faculty of Medicine, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France; †Epôle de Génoinformatique, Institut Jacques Monod, Unité Mixte de Recherche 7592, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris Diderot University, University Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ‡INSERM, Unité Mixte de Recherche 894, Centre de Psychiatrie et Neuroscience, Paris, France; and §INSERM, Unité 1141, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Hôpital Robert Debré, Paris, France

ABSTRACT: Spaceflights are known to affect the immune system. In a previous study, we demonstrated that hypergravity exposure during murine development modified 85% of the T-cell receptor (TCR)-β repertoire. In this study, we investigated whether socioenvironmental stressors encountered during space missions affect T lymphopoiesis and the TCR-β repertoire. To address this question, pregnant mice were subjected throughout gestation to chronic unpredictable mild stressors (CUMS), a model used to mimic socioenvironmental stresses encountered during space missions. Then, newborn T lymphopoiesis and the TCR-β repertoire were studied by flow cytometry and high-throughput sequencing, respectively. No change in thymocyte maturation or TCR expression were noted. TCR-β repertoire analysis revealed that 75% of neonate TCR-β sequences resulted from the expression of 3 variable (V)β segments and that this core repertoire was not affected by CUMS. However, the minor repertoire, representing 25% of the global repertoire, was sensitive to CUMS exposure. We also showed that the variable (diversity) joining [V(D)J] recombination process was unlikely to be affected. Finally, we noted that the CUMS neonatal minor repertoire was more self-reactive than the one of control pups. These findings show that socioenvironmental stressors such as those encountered during space missions affect a fraction (25%) of the TCR-β repertoire and that these stressors could increase self-reactivity.—Fonte, C., Kaminski, S., Vanet, A., Lanfumey, L., Cohen-Salmon, C., Ghislin, S., Frippiat, J.-P. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR-β repertoire and increase its self-reactivity. FASEB J. 33, 000–000 (2019). www.fasebj.org

KEY WORDS: lymphopoiesis · immunity · T cell · lymphocytes · antigen receptor

Space is an adverse environment in which astronauts encounter different stressors (radiation, change in gravity force, and socioenvironmental perturbation). Medical and biologic findings from space missions have demonstrated that this extreme environment negatively affects the immune system (1, 2). Indeed, 15 of the 29 astronauts involved in Apollo missions developed bacterial or viral infections during, immediately after, or within 1 wk of landing (3). Furthermore, medical data collected on 46 astronauts who spent 6 mo onboard the International Space Station revealed that 46% of them faced immunologic problems (4). It is therefore important to determine how these conditions affect the development of immune cells required to mount an immune response.

Some studies have been performed with that goal in mind. A decreased number of bone marrow myeloid progenitors, as measured by colony-forming assays, was observed in space (5, 6). The culture of human $CD34^+$ bone marrow progenitors during spaceflight confirmed the inhibitory effect of microgravity on erythropoiesis and myelopoiesis (7). Changes in the maturation of granulocytic cells in the bone marrow of C57BL/6 mice were also reported after a 13 d spaceflight (8). Concerning lymphocyte development, it was shown that hindlimb unloading, a model frequently used to simulate spaceflight conditions, leads to

ABBREVIATIONS: 11β-HSD, 11β-hydroxysteroid dehydrogenase; APC, allophycocyanin; CDR, complementarity-determining region; CUMS, chronic unpredictable mild stressors; DN, double negative; DP, double positive; EF, elongation factor; GSP, gene-specific primer; HTS, high-throughput sequencing; NR3C, nuclear receptor subfamily 3, group C; PE, phycoerythrin; RAG, recombination activating gene; RSS, recombination signal sequence; SN, single negative; SP, single positive; TBP, TATA binding protein; TCR, T-cell receptor; V(D)J, variable (diversity) joining

[1] These authors contributed equally to this work.

[2] Correspondence: EA 7300, Stress Immunity Pathogens Laboratory, Faculty of Medicine, Université de Lorraine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. E-mail: jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr

doi: 10.1096/fj.201800969R

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

decreased murine B lymphopoiesis, similar to aging (9). T lymphopoiesis was also shown to be sensitive to gravity changes, because reductions in $CD4^+$, $CD8^+$, and $CD4^+CD8^+$ thymocyte populations were reported when murine fetal thymuses were cultured under clinorotation (10). Furthermore, it was shown that hypergravity exposure during gestation modify 85% of the T-cell receptor (TCR)-β repertoire of newborn mice (11).

TCR-β diversity is essential for host protection because 95% of T cells found in secondary lymphoid organs harbor a TCR-αβ receptor (12, 13). This diversity is generated by the random association of different gene segments: a variable (V) and a joining (J) segment for the α chain and a variable (V), a diversity (D) and a joining (J) segment for the β chain. These associations happen during T lymphopoiesis, thanks to the V(D)J recombination process which joins a D with a J segment and then a V segment with the DJ pair. V(D)J recombination requires several effectors, such as recombination-activating gene (RAG) proteins that interact with recombination signal sequences (RSSs) located 3′ of V, on both sides of D, and 5′ of J segments and inflict DNA single-strand breaks between coding V, D, or J segments and noncoding RSSs, leading to the formation of hairpin-sealed coding ends (14). In further steps, Artemis opens hairpin loops, eventually creating palindromic sequences corresponding to short inverted repeats of the segment terminal sequence (15). These steps are followed by nucleotide deletions and insertions at the junctions and ends with ligation. The end product is the third complementarity-determining region (CDR)-3 of TCR chains, a short and highly variable region that interacts with antigenic peptides presented by major histocompatibility complex molecules.

In this study, we investigated whether socioenvironmental stressors encountered during space missions affect T lymphopoiesis and TCR-β repertoire diversity. To address this question, we exposed pregnant mice, throughout gestation, to chronic unpredictable socioenvironmental stressors of various nature and mild intensity separated by resting periods (CUMS model). Indeed, we recently showed that this model mimics some spaceflight-induced immunologic changes (16). Then, we studied newborns' T lymphopoiesis and TCR-β repertoire by flow cytometry and high-throughput sequencing (HTS), respectively. We decided to work on pups conceived and born under this combination of stressors to ensure that T lymphopoiesis and the creation of TCR-β repertoire diversity occurred exclusively under these conditions, as both processes start *in utero*, thereby eliminating the potential effects of previous development under standard conditions.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were conducted on 10-wk-old C57BL/6N mice provided by Charles River Laboratories (Bois des Oncins, Saint-Germain-Nuelles, France). On arrival, animals were housed for 2 wk in standard cages under controlled conditions in the animal facility of the INSERM Unité Mixte de Recherche 894 laboratory (Paris, France). These conditions were as follows: animals were provided food and water *ad libitum* in a quiet room with constant temperature (22°C), 50% relative humidity, and 12-h light–dark cycles (dark period 8 PM–8 AM). Females and males were then mated by placing 4 females with a different male every day for 3 d. Females were then randomly divided into 2 groups: 1 control group housed in standard cages in groups of 2 and 1 group of mice individually subjected to CUMS. CUMS exposure extended up to the postpartum day. This experiment was performed twice. The first experiment generated 28 control pups and 29 CUMS pups. The second experiment generated 24 control pups and 31 CUMS pups. Experimental procedures were conducted in accordance with National Legislation. Furthermore, the French Ministry of Research approved the CUMS procedure (00966.02).

CUMS exposure

Mice of the CUMS groups were subjected to 6 different unpredictable mild socioenvironmental stressors: 30° cage tilt for 1, 2, or 15 h; confinement in a small cage (11 × 8 × 8 cm) for 1 or 2 h; paired housing for 2 h; one 15 h overnight period with difficult access to food without a reduction in the daily food ration; one 15-h overnight period with permanent light; and one 15-h overnight period in a soiled cage (50 ml of water in 1000 ml of bedding). These stressors were delivered according to Pardon *et al.* (17) and Gaignier *et al.* (16). Stress periods that lasted 1 h in the morning, 2 h in the afternoon, and 15 h at night (6 PM–9 AM) were always separated by stress-free intervals of at least 2 h to avoid any habituation process. Animals were also placed on a reversed light/dark cycle between Friday evening and Monday morning. This procedure was scheduled over a 1-wk period and repeated throughout the 3 wk of experimentation. The control group was left undisturbed in another room of the animal facility, with 2 mice per standard cage (37.5 × 21.5 × 18 cm).

Sample collection

At birth, pups were weighed and put to death by decapitation between 8 and 10 AM to avoid fluctuations of corticosterone concentrations caused by circadian rhythm. Blood samples collected during decapitation were allowed to clot at ambient temperature for 15 min and then centrifuged at 4°C and 4000 rpm for 20 min to collect serum samples that were stored at −80°C until analysis. Tails were frozen at −80°C until analysis. Thymuses were immediately dissociated in PBS-fetal bovine serum 2% buffer. Thymocytes were then counted with a Scepter 2.0 Cell Counter (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA); 1.5×10^6 cells were used for flow cytometry analyses and 10^7 cells for RNA extraction.

Genotyping

To determine the gender of each pup, tail genomic DNA was extracted with the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France). This DNA was used to amplify the Forkhead box-L2 (*Foxl2*) gene present in female and male genomes and the sex-determining region Y (*Sry*) gene present only in the male genome. PCR was performed with 100–200 ng genomic DNA, 0.6 U Taq Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 0.7 μM of specifics primers (**Table 1**). PCR products

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

were run on a 1% agarose gel to identify males (*Foxl2*$^+$ *Sry*$^+$) and females (*Foxl2*$^+$ *Sry*$^-$).

Corticosterone quantification

Corticosterone was quantified in serum samples using the Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA). All samples were analyzed in duplicate. Calibrators were included in the plate. Absorbance at 405 nm was measured and concentrations, calculated from a standard curve, were expressed in nanograms per milliliter.

Flow cytometry

Thymocytes (5×10^5) were stained with the following combinations of antibodies: anti-CD4-phycoerythrin (PE) (RM4-5), anti-CD8a-PE-Cy7 (53-6.7), anti-CD25-FITC (3C7), and anti-CD44-allophycocyanin (APC) (IM7); or anti-CD4-PE (RM4-5), anti-CD8a-PE-Cy7 (53-6.7), and anti-TCR-β-FITC (H57-597). Cell populations were identified based on the expression of the following markers: DN1 (CD4$^-$ CD8$^-$ CD25$^-$ CD44$^+$), double negative (DN)-2 (CD4$^-$ CD8$^-$ CD25$^+$ CD44$^+$), DN3 (CD4$^-$ CD8$^-$ CD25$^+$ CD44$^-$), DN4 (CD4$^-$ CD8$^-$ CD25$^-$ CD44$^-$), double positive (DP) (CD4$^+$ CD8$^+$ CD25$^-$ CD44$^-$), immature simple positive (ISP)-8 (CD8$^+$ CD3^{lo} TCR^{lo}), simple positive (SP)-4 (CD4$^+$ CD8$^-$ CD25$^-$ CD44$^-$), and SP8 (CD4$^-$ CD8$^+$ CD25$^-$ CD44$^-$ CD3^{hi} TCR^{hi}). Cells were analyzed using the CyAn ADP flow cytometer (Beckman-Coulter, Indianapolis, IN, USA), from the ImagoSeine platform (Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7592, Institut Jacques Monod, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité). Thymocytes from 20 control and 26 CUMS newborns of the first experiment and 15 control and 20 CUMS newborns of the second experiment were analyzed with Flowjo software (Ashland, OR, USA). Anti-CD4-PE (RM4-5), anti-CD25-FITC (3C7), anti-rat IgG2a κ isotype control FITC (RTK2758), and anti-TCR-β-FITC (H57-597) were purchased from BioLegend (Ozyme; Saint Quentin Yvelines, France). Anti-CD8a-PE-Cy7 (53-6.7), anti-CD44-APC (IM7), anti-rat IgG2a κ isotype control Pe-Cy7 (eBR2a), anti-rat IgG2a κ isotype control PE (eBR2a), and anti-rat IgG2b κ isotype control APC (eB149/10H5) were purchased from eBioscience (Paris, France).

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted form thymocytes with the Nucleospin RNA Plus Kit (Macherey Nagel). RNA was reverse transcribed by using random primers, RNaseOut and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). qPCRs were performed with Takyon No Rox Sybr 2× Master Mix Blue Deoxythymidine Triphosphate (Eurogentec, Angers, France) and a Mastercycler Realplex^2 Real-Time PCR System (Eppendorf, Hamburg, Germany). The cycling protocol was as follows: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at the annealing temperature indicated in Table 1. Each quantitative PCR was performed in triplicate. Nuclear receptor subfamily 3, group C (NR3C)-1 and 11β-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)-1 relative expression by comparison to 3 housekeeping transcripts [elongation factor 1 (Ef1)-a, glucuronidase-β, and TATA binding protein (TBP)] were performed as described by Huin-Schohn *et al.* (18). Primer pairs were designed in different exons to ensure that they could not hybridize to potential traces of genomic DNA, and their specificity was checked with a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search through the National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA).

Sequencing

The VDJ rearrangements contained in newborn TCR-β heavy chain mRNAs were amplified by 5′ rapid amplification of cDNA ends PCR using the Smarter RACE cDNA Amplification Kit (Takara Bio, Inc., Mountain View, CA, USA). In brief, for the 2 CUMS and control experiments, equal amounts of total RNA extracted from the thymus of 6 CUMS males (3 randomly chosen in 2 different litters) were mixed and reverse transcribed according to the instructions of the manufacturer. The same method was used with RNA extracted from the thymus of 6 CUMS females, 6 control males and 6 control females. Then, 2 successive PCRs were performed to amplify TCR-β VDJ associations in control and CUMS samples of both genders. The first PCR was performed with gene-specific primer (GSP)-1 (Table 1), which anneals to the first constant domain of Cβ1 and Cβ2 and the universal primer mix (UPM) of the kit. The second PCR was performed on an aliquot of the first PCR using another gene-specific primer (GSP-2), which anneals upstream of GSP-1 in the first constant domain of Cβ1 and Cβ2, and the nested universal primer (NUP), which anneals to UPM. PCR products generated by the second PCR were separated on an agarose gel, and those of the expected size were purified with the Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey Nagel). Finally, libraries were prepared by adding Illumina adapter sequences (NEBNext Index Primer; Illumina, San Diego, CA, USA) by PCR. HTS of these libraries was conducted from both ends to get the entire sequences of VDJ rearrangements using the MiSeq Illumina apparatus of the FR3209 research federation (Vandœuvre-lès-Nancy, France) following Illumina's standard protocol. Sequencing data were analyzed using IMGT/High V-quest software (19) (*http://www.imgt.org*). Then, obtained data were analyzed with a software specifically designed for this project. Sequencing data have been deposited to the NCBI Sequence Read Archive (*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra*) under accession numbers SRP116396 (first experiment) and SRP116369 (second experiment).

Software dedicated to the analysis of VDJ sequences

A software written in Perl, an efficient editing language, was created to calculate the parameters necessary for our studies. This software parsed 8 different files, corresponding to 8 different samples, produced by IMGT/High V-quest. Two to four seconds of execution was necessary to analyze a file. This execution time was proportional to the number of lines to process, each line corresponding to 1 sequence. For the first experiment, there were 391,106 lines for control females, 203,078 lines for control males, 321,252 lines for CUMS females, and 172,252 lines for CUMS males. For the second experiment, there was 350,000 lines for control females, 442,121 lines for control males, 350,000 lines for CUMS females, and 375,190 lines for CUMS males. The software examined each row and defined those having a CDR3 and a productive functionality. The redundancy of this set of CDR3 sequences was then calculated. A new set of results consisting of 1 representative of each CDR3 sequence expressed 1 or more times was then generated. The number of sequences with unique CDR3s was 16,242 and 12,674 for control females, 10,054 and 21,106 for control males, 14,400 and 14,156 for CUMS females, 9,775 and 15,378 for CUMS males, the first value corresponding to the first experiment and the second one to the second experiment. From this set of results, the following were calculated: the frequency of each V, D and J segment; the length of D; the number

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

TABLE 1. *Primers*

Target	Sequence, 5′–3′ Forward	Reverse	Annealing temperature (°C)
Sry	AGCCTGCAGTTGCCTCAACA	GTGGGGATATCGACAGGCTGCAA	63
FoxL2	GGCGAGCGCAAGGGCAACTA	TCCTCCGCTCCCGAAGAGCC	63
NR3C1	CAAGGGTCTGGAGAGGACAA	TACAGCTTCCACACGTCAGC	61
11bHSD1	TGCTTATTCTAAACCACATCAC	TCTGCTTCAGCATGGGCAAGGC	58
Ef1a	AGAACCAGGCCAGAACCGAA	GCAGCTGAGACTCCTTTCCA	61
GUSB	CCGATTATCCAGAGCGAGT	CTCAGCGGTGACTGGTTCG	61
TBP	CAAACCCAGAATTGTTCT	ATGTGGTCTTCCTGAATCCCT	58
GSP1	CCCACTGTGGACCTCCTTGCCATTCACC		68
GSP2	TACACGACGCTCTTCCGATCTCACGTGG TCAGGGAAGAAGCCCCTGGCC		68
NUP	CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAAGC AGTGGTATCAACGCAGAGT		68

GUSB, glucuronidase-β; *NUP*, nested universal primer.

of nucleotides deleted at 3′-V and 5′-J extremities; the number of sequences having added nongenomic nucleotides; the frequencies of palindromes at V-D and D-J junctions, and finally associations of all V segments with all J segments for combinations having no D, D1, or D2 segment.

Statistics and dispersion indexes

StatView software (SAS Institute, Cary, NC, USA) was used to perform statistical analyses of newborn body and thymus weights, corticosterone serum concentrations and quantitative real-time-PCR results. Homogeneity of variance was determined using the Levene test and the normality of distribution was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. When homogenous variances and distributions were observed, 2-way ANOVAs were done. When the variance and distribution were not homogeneous, Mann-Whitney nonparametric tests were performed. Values of $P < 0.05$ indicate significance. All results are shown as means ± SEM.

Indexes of dispersion were used to determine if differences in TCR gene segment expression, or other criteria, exist between

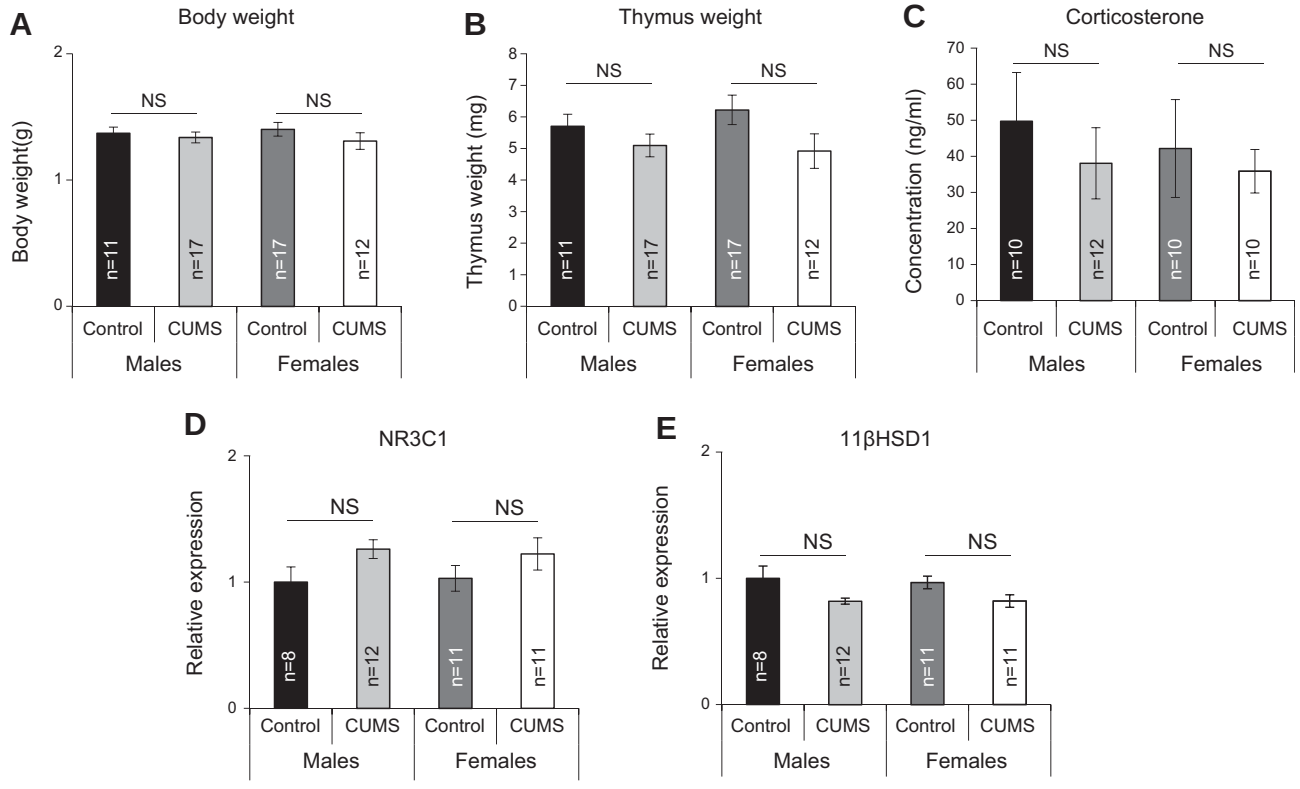


Figure 1. Evaluation of stress in control and CUMS newborns. *A*, *B*) Newborn body (*A*) and thymus (*B*) weights. *C*) Corticosterone concentrations in newborn sera determined by ELISA. *D*, *E*) Quantification, by quantitative real-time PCR of NR3C-1 (*D*) and 11β-HSD-1 (*E*) mRNAs in newborn thymocytes. These transcripts encode respectively the glucocorticoid receptor and 11β-HSD-1 involved in corticosterone activation. mRNA levels were normalized to 3 housekeeping transcripts. The relative value obtained with control males was set to 1. Results are representative of the 2 CUMS exposures ±SEM. No statistically significant differences were found by 2-way ANOVA.

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

TABLE 2. *Analysis of T lymphopoiesis in pups produced by control or CUMS-exposed mice*

Variable	DN1	DN2	DN3	DN4	DP	SP4	SP8
Ctl (n = 20)	0.63 ± 0.07	0.36 ± 0.04	2.23 ± 0.10	2.11 ± 0.21	81.66 ± 1.05	3.22 ± 0.49	1.67 ± 0.17
CUMS (n = 26)	0.53 ± 0.02	0.38 ± 0.03	2.59 ± 0.20	2.36 ± 0.18	81.80 ± 0.60	2.53 ± 0.28	2.13 ± 0.10

Data are percentages ± SEM of total newborn thymocytes in the different maturation stages determined with anti-CD25, anti-CD44, anti-CD4, and anti-CD8 antibodies. Results are representative of the 2 CUMS exposures. Two-way ANOVA did not reveal statistically significant differences. DN, double negative cells; DP, double positive cells; SP, simple positive cells.

groups. The following formula shows, for example, how these indexes were calculated for TCR gene segment expression (Eq. 1):

$$I(\text{group A} - \text{group B}) = 0.5 * \sum_{i=1}^{n} |\, F \text{ of segment}_i \text{ from group A} - F \text{ of segment}_i \text{ from group B})|$$

where F is the frequency of a given V segment in 1 group of animals and n is the number of V segments present in the murine TRB locus on chromosome 6.

These indexes range between 0 and 1. Two tests were performed to analyze obtained indexes. First, we determined whether indexes were statistically superior to a 0.05 threshold (which corresponds to a 5% variation of indexes) using a unidirectional nonparametric Mann-Whitney test and values of $P < 0.05$ to indicate significance. When more than 2 groups of indexes were considered, the Kruskal-Wallis nonparametric test and the *post hoc* associated test were performed. Second, we compared CUMS *vs.* control indexes as well as female *vs.* male indexes to evaluate the effects of CUMS exposure or gender. In this case, statistical analyses were performed using paired tests. For comparison of 2 groups of indexes, Wilcoxon tests were performed. For comparison of more than 2 groups of indexes, the Friedman test and its *post hoc* associated test were performed. All these statistical analyses were performed with the programs on the Anastats website (*http://www.anastats.fr/outils.php*).

RESULTS

Evaluation of stress in newborn mice

To evaluate stress in newborn mice, we first determined body and thymus weights. No difference was observed between the different groups of pups (**Fig. 1A, B**). We also quantified serum corticosterone (Fig. 1*C*), the most studied stress hormone in rodents, and transcripts coding for proteins involved in corticosterone action within the thymus (Fig. 1*D, E*) because circulating and locally produced glucocorticoids can impact T lymphopoiesis (20). Again, no statistically significant difference was detected between groups, suggesting that maternal CUMS exposure minimally stresses newborns.

T lymphopoiesis in newborns

To be sure that T lymphopoiesis was not affected by CUMS exposure, we determined the percentages of pups' thymocytes according to their maturation stage. Control and CUMS pups were randomly selected for these analyses because it was not possible to genotype them before performing flow cytometry analysis. Later on, when genotyping data were available, we noted that we did not obtain a balanced number of males and females between the different litters. Consequently, flow cytometry data could not be analyzed according to gender. As expected, **Table 2** shows that the DP population was predominant in newborns' thymus, whereas the DN1 and DN2 populations were the less abundant cell types. DN3 and DN4 were as abundant as the more mature SP4 and SP8 stages. These low amounts of mature T cells were age-related. No significant difference between CUMS and control newborns was observed at any stage of T-cell maturation. We also determined TCR-β expression levels in DN, DP, ISP8, SP4, and SP8 cells (**Table 3**). Again, no differences were observed between groups. These data, combined with those presented above, demonstrate that exposure to chronic, unpredictable, mild socio-environmental stressors during gestation did not influence neonatal T-cell development.

Consequences of CUMS exposure on newborn TCR-β repertoire

Although CUMS exposure did not impact thymocyte subpopulations and TCR-β expression on these cells, we could not exclude that it did not affect the repertoire of

TABLE 3. *TCR-β expression levels*

Variable	DN	DP	ISP8	SP4	SP8
Ctl (n = 20)	6.5 ± 0.1	9.5 ± 2.3	14.2 ± 0.2	154.6 ± 10.4	178.5 ± 1.4
CUMS (n = 26)	6.6 ± 0.3	11.6 ± 0.5	14.3 ± 0.7	152.4 ± 14.2	181.8 ± 6.7

TCR-β expression on DN, DP, ISP8, SP4 and SP8 cells (geometric mean of fluorescence intensity) determined with anti-CD4, anti-CD8 and anti-TCR-β antibodies. Results are representative of the 2 CUMS exposures. Data are means ± SEM. Two-way ANOVA did not reveal statistically significant differences. DN, double negative cells; DP, double positive cells; ISP8, immature simple positive cells; SP, simple positive cells.

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

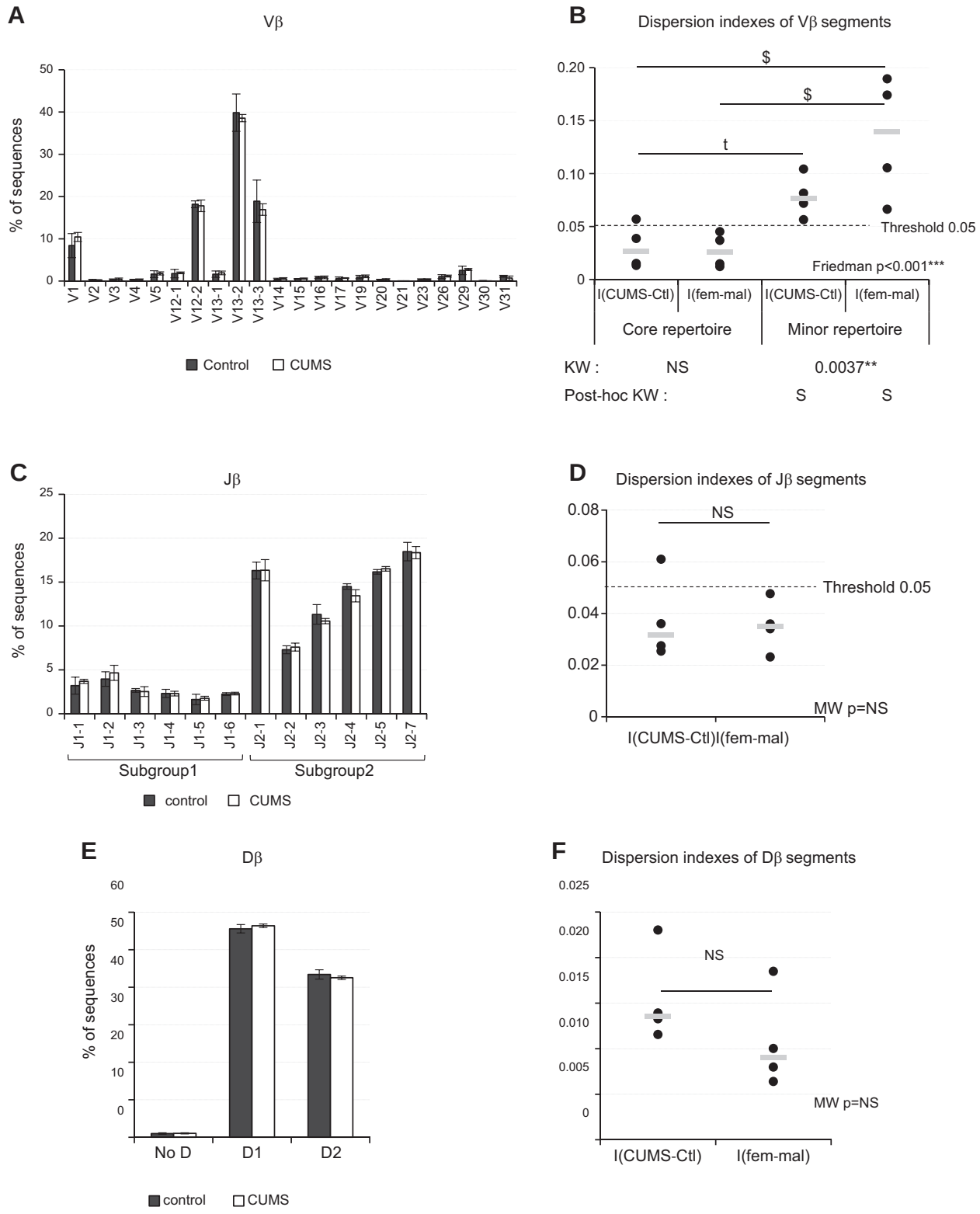


Figure 2. TCR-β gene segment usages in control and CUMS newborns. *A, C, E*) Vβ (*A*), Jβ (*C*), and Dβ (*E*) segment usages in TCR-β transcripts of pups. Means of 4 independent measures from 2 independent experiments. Means ± SD are shown. *B, D, F*) Dispersion indexes of Vβ (*B*), Jβ (*D*), and Dβ (*F*) segments for CUMS *vs.* control and for female *vs.* male comparisons. Each dot corresponds to 1 measure, and the gray line indicates the median. Statistically significant differences by comparison to the 0.05 threshold were observed for the minor Vβ repertoire for both comparisons with the Kruskal-Wallis (KW) test and its *post hoc* associated test. For Jβ and Dβ indexes, no statistically significant differences by comparison to the threshold were noted with the Mann-Whitney (MW) test. Furthermore, for Vβ dispersion indexes, statistically significant variations between comparisons were identified with the Friedman test and its associated *post hoc* test, whereas no such difference was noted for Jβ or Dβ by the Wilcoxon test. NS, no significant difference between comparisons; S, statistically significant difference from the threshold ($statistically significant differences between comparisons); t, a tendency.

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

TCR-β chains. To examine this possibility, we constructed TCR-β cDNA libraries, which were subjected to HTS, with RNA extracted from the thymus of 6 males and 6 females belonging to 2 different litters for each group of pups and for both experiments. The purpose of this strategy was to reduce interindividual variability. Then, we extracted unique sequences from HTS data to eliminate potential PCR biases and clonal expansions. This selection was based on CDR-3 nucleotide sequences, because it is the most diverse part of TCR transcripts. We obtained 9,775–21,106 unique sequences per group of which 15–18% were nonfunctional and not analyzed.

TCR-β segment usages

As functional TCR-β genes are created by the assembly of V, D, and J segments during T lymphopoiesis, we analyzed V, D, and J segment usages in our libraries. The analysis of V-β segment usage (**Fig. 2*A***) revealed that the newborn TCR-β repertoire can be divided into a core repertoire resulting from the expression of 3 Vβ segments (V12-2, V13-2 and V13-3) and a minor repertoire resulting from the expression of the other 19 Vβ segments available in the TRB locus located on murine chromosome 6. Core and minor repertoires represented 75 and 25% of the total repertoire, respectively. Furthermore, Vβ dispersion indexes revealed that the core repertoire was very stable because its indexes were below the 5% threshold (Fig. 2B). In addition, the core repertoire was not affected by gender or CUMS exposure, given that no statistically significant difference was noted between both comparisons. In contrast, the minor repertoire was more variable, because its indexes were statistically above the 5% threshold. Moreover, a statistically significant difference was observed between core and minor repertoires for the female *vs.* male comparison and a trend toward statistical significance was observed for the CUMS *vs.* control comparison.

Concerning other gene segments, we noted that Jβ segments belonging to subgroup 2 were more frequently used than those belonging to subgroup 1 (Fig. 2*C*). In the same way, we noted that the 2 available D segments were used by control and CUMS pups with a preference for D1 (Fig. 2*E*). The analysis of Jβ and Dβ dispersion indexes (Fig. 2*D, F*) showed that variations were always below the 5% threshold.

Thus, although no change in Jβ or Dβ segment usages were noted, our data revealed differences between core and minor Vβ repertoires and suggested that CUMS exposure during gestation affects the minor repertoire.

Associations between TCR-β gene segments

To precise these results, we studied associations between Vβ and Jβ segments in core and minor repertoires (**Fig. 3**). Ds were not taken into account, because there are only 2 D segments in the murine TRB locus and the indexes did not reveal any changes in their expression (Fig. 2E, F). These analyses showed that VβJβ associations are stable within the core repertoire,

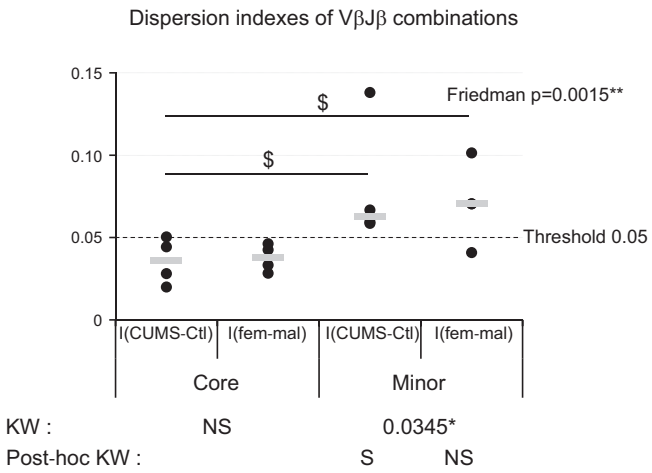


Figure 3. Dispersion indexes of combinations between Vβ and Jβ segments in core and minor repertoires. Indexes were calculated for CUMS *vs.* control and for female *vs.* male comparisons in both repertoires. Each dot corresponds to 1 measure and the gray line indicates the median. Statistically significant variations by comparison to the 0.05 threshold were determined with the Kruskal-Wallis (KW) test and its *post hoc* associated test with the results indicated beneath the graph. A statistically significant difference, by comparison to the threshold, was noted only for the CUMS *vs.* control comparison within the minor repertoire. Furthermore, using the Friedman test and its *post hoc* test, we noted that dispersion indexes for both CUMS *vs.* control comparisons were significantly different. NS, no significant difference; S, statistically significant difference from the threshold ($statistically significant differences between comparisons, by *post hoc* Friedmann test).

regarding both the 5% threshold and the 2 types of comparisons (Figs. 2B and 3). Again, we noted that minor repertoire dispersion indexes were above the 5% threshold but in this case, a statistically significant difference was observed only for the CUMS *vs.* control comparison. A difference was also observed between core and minor repertoires for the CUMS *vs.* control but not for the female *vs.* male comparison.

These data confirm that the core repertoire does not depend on gender and is not affected by CUMS exposure during gestation, whereas the minor repertoire is more variable and sensitive to this combination of socio-environmental stressors.

Impact on V(D)J recombination

Given that the TCR-β repertoire is created by V(D)J recombination during T-cell maturation, we wondered whether this process could be altered. To address this question, we first examined signatures left by RAG proteins. When RAG proteins cut DNA between coding segments and RSSs, some nucleotides can be deleted at the 3′-end of V, on both sides of D, and at the 5′-end of the J segments. Consequently, we determined the length of Dβ and the number of nucleotides trimmed off Vβ and Jβ segments to find whether the position of RAG cleavage sites would be affected by gender or CUMS exposure (**Fig. 4**). We observed that 27% of Vβ (Fig. 4*A*) and 13.5% of Jβ (Fig. 4*C*) sequences did not present deleted nucleotides

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

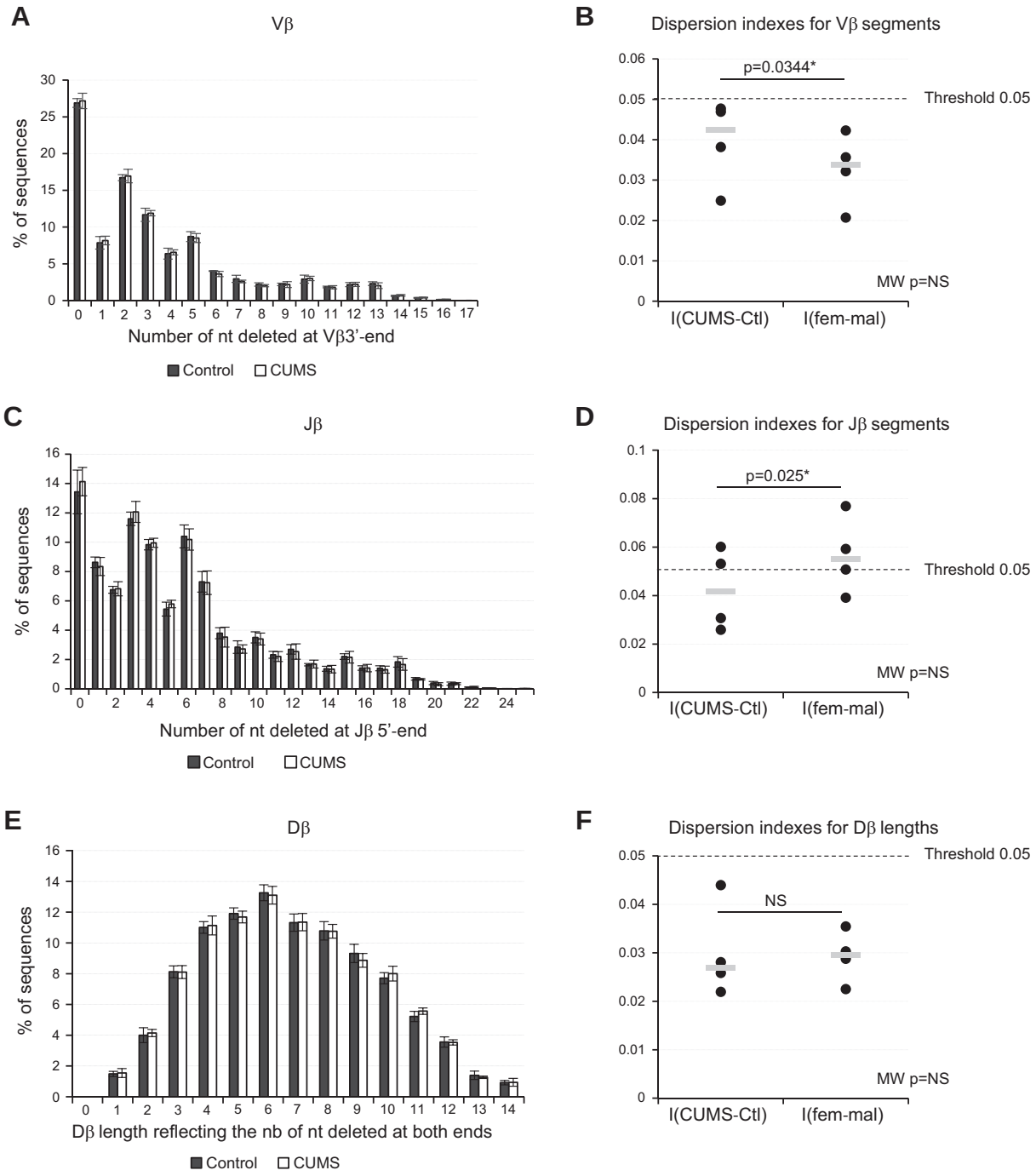


Figure 4. Nucleotides trimmed off Vβ, Jβ, and Dβ segments. *A*, *C*, *E*) Distribution of sequences according to the number of genomic nucleotides removed at the 3′-end of Vβ, at the 5′-end of Jβ, or at both ends of the Dβ segments during V(D)J recombination. Means of 4 independent measures from 2 independent experiments ± SD are shown. *B*, *D*, *F*) For each analysis, indexes of dispersion for CUMS *vs.* control and for female *vs.* male comparisons were calculated. Each dot corresponds to 1 measure, and gray lines indicate medians. Mann-Whitney (MW) tests did not reveal statistically significant differences by comparison to the 0.05 threshold for the 3 dispersion indexes. Wilcoxon tests showed that dispersion indexes for CUMS *vs.* control comparisons were different from those for female *vs.* male comparisons regarding the number of nucleotides deleted at the 3′-end of Vβ or at the 5′-end of Jβ segments.

and that the maximum number of missing nucleotides was 17 for Vβ and 24 for Jβ. These observations indicate that the area subjected to RAG action was wider on Jβ than on Vβ segments. Furthermore, Vβ missing 1 nucleotides were less frequent than those missing 2 nucleotides. In the same way, Jβ missing 1 or 2 nucleotides were less frequent than those missing 3 or 4 nucleotides. These observations suggest either that VDJ associations missing the last nucleotides of Vβ and the 2 first nucleotides of Jβ were less frequently selected or that RAG proteins were less easily cut close to recombination signals. Variations in the number of deleted nucleotides were not significantly

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

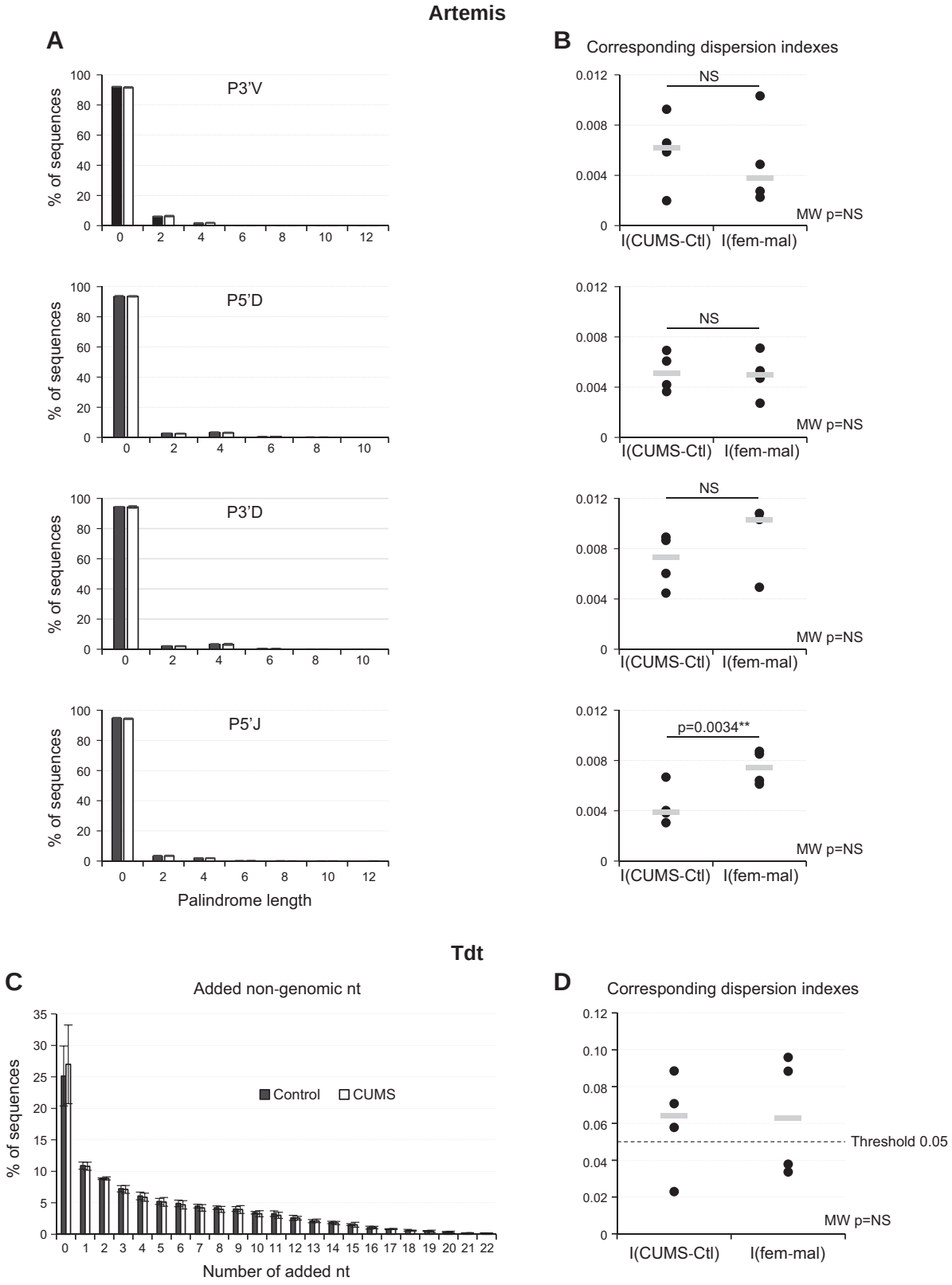


Figure 5. Palindromes created by Artemis and nucleotides added by Tdt during V(D)J recombination. *A*, *C*) Distribution of sequences according to palindrome length and location or to the number of added nongenomic nucleotides. Means of 4 independent measures from 2 independent experiments ± SD are shown. P3′V, palindromes in 3′ of V segments; P5′D, palindrome in 5′ of D segments; P3′D, palindromes in 3′ of D segments; and P5′J, palindromes in 5′ of J segments; *B*, *D*) Corresponding dispersion indexes for CUMS *vs.* control and female *vs.* male comparisons. Each dot corresponds to 1 measure, and the gray line indicates the median. Mann-Whitney (MW) tests did not reveal statistically significant differences by comparison to the 0.05 threshold. Wilcoxon tests showed that dispersion indexes for the CUMS *vs.* control comparison were different from those for the female *vs.* male comparison regarding the number of palindromes at the J 5′-end.

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

different from the 5% threshold for the 3 types of segments, even if some significant differences were noted between comparisons (Fig. 4B, D, F).

Signatures left by 2 other proteins involved in V(D)J recombination were similarly analyzed: Artemis, which is responsible for palindrome appearance, and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), which is responsible for nucleotide additions. We noted that a mean of 93% of the sequences did not present palindromes at their V–D or D–J junctions (Fig. 5A) and that corresponding dispersion indexes (Fig. 5*B*) were below the 5% threshold. In the same way, dispersion indexes of sequences, with or without added nucleotides, were not significantly different from the threshold (Fig. 5D).

These data indicate that RAG, Artemis, and Tdt activities, and consequently, the V(D)J recombination process, are unlikely to be affected by gender or CUMS exposure.

Potential impact on immunity

Finally, we wondered about the impact of minor repertoire changes on host immunity. To address this question, we searched for 34 CDR-3β, known to have self-reactive properties, and 91 CDR-3β, associated with 3 other categories of immune reactions (immunity to foreign pathogens, allograft reactions, or tumor-related T cells), in healthy C56BL/6 mice (21) in our sets of neonatal CDR3 sequences. Despite the inherent limitation of such an approach (it is limited by the number of CDR3s with specificity established in healthy mice of the same strain), the findings clearly showed that CUMS and female neonatal minor repertoires contained statistically more self-reactive CDR3s than the minor repertoire of control or male pups, respectively (**Fig.** 6A, C). Moreover, both repertoires contained CDR3, which can contribute to mounting an immune response (Fig. 6B, D).

DISCUSSION

In this study, we investigated the impact of prenatal exposure to the CUMS model, used to mimic socioenvironmental stressors encountered during space missions (16), on newborn T lymphopoiesis and the TCR-β repertoire.

We first noted that this model that does not modify gestation duration, litter size, or litter weight (22) but alters maternal pup care behavior (17) and sensitizes the offspring to neonatal excitotoxic brain lesions (23), does not affect T-cell maturation or thymocyte TCR expression.

Reaching the second objective required the characterization of the neonatal TCR-β repertoire of C57BL/6 mice. Comparison of this repertoire with the one previously described for adult mice (24–26) revealed a set of characteristics already fixed at birth, such as the preference for Dβ1 over Dβ2 and the marked preference for Jβ segments belonging to subgroup 2 over those belonging to subgroup 1, which was shown to be independent of repertoire selection events (24). Other parameters were different between newborns and adults, such as the frequency of nonfunctional TCR-β transcripts (~2% in adults *vs.* 15–18% in newborns) and V segment usage

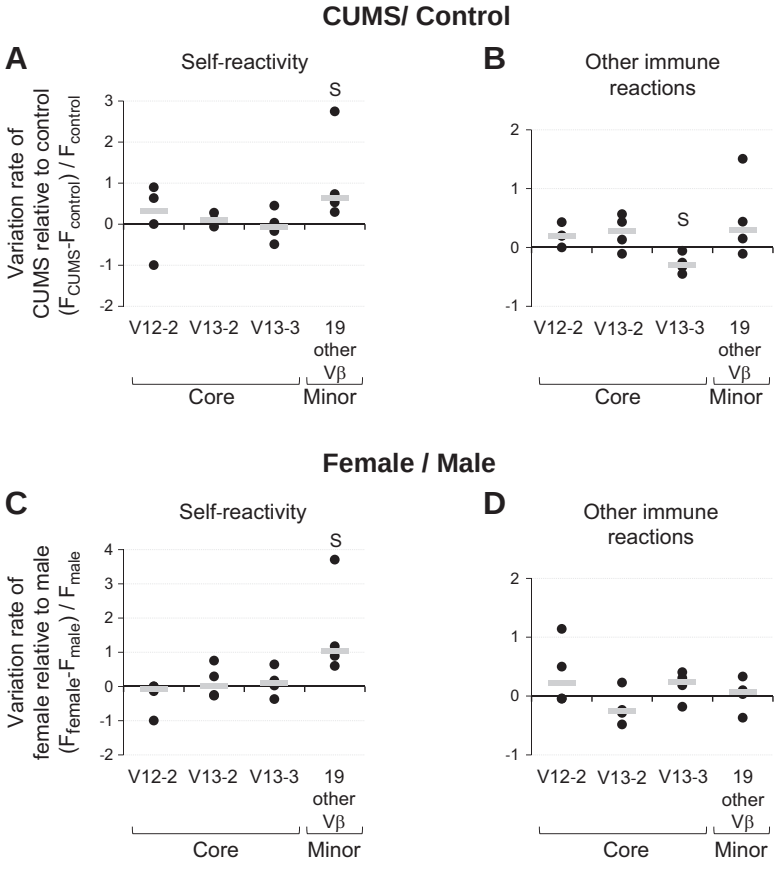


Figure 6. Occurrences of CDR3s associated with immune functions in neonatal core and minor TCR-β repertoires. *A*, *C*) Variations of occurrence frequency of CDR3s associated with self-reactivity in CUMS newborns by comparison to controls or in female newborns by comparison to males. *B*, *D*) Variation of occurrence frequency of CDR3s associated with other immune reactions in CUMS newborns by comparison to controls or in female newborns by comparison to males. Frequencies were determined by aligning sequences obtained in this study with 34 CDR3s associated with self-reactivity or 91 CDR3s associated with other immune reactions (immunity to foreign pathogens, allograft reactions, or tumor-related T cells) in healthy C57BL/6 mice. Analyses performed on CDR3 of 10, 11, 12 and 13 aa. Criteria for CDR3 comparison: aa difference, ≤2 ; *e* value, ≤0.002; identity, ≥80%; matching, ≥80%; and no gap. S, significantly different from 0 as revealed by Mann-Whitney test.

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

(TCR-β repertoire dominated by 3 Vβ in newborns, which is not the case in adults). Such differences between neonatal and adult repertoires have already been reported. It was shown, for example, that the number of expressed human Vβ segments increases between the prenatal period and the age of 1–2 yr and that the expression of some Vβ segments is age related (27), indicating that the diversity of the TCR repertoire is age dependent. In the same

Figure 7. Amino acid frequencies at each position within TCR-β CDR3 regions. CDR3s were defined according to the international ImMunoGeneTics information system. The height of each letter indicates the relative frequency of the corresponding amino acid at that position. CDR3s have been classified according to their size. Amino acids were grouped into 6 categories: polar GYC (green), polar amide group QN (purple), polar alcohol group ST (yellow), basic KRH (blue), acidic DE (red) and hydrophobic AVLIPWFM (black); *n*, number of sequences used to generate each panel. Panels constructed with Weblogo (39).

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

way, Sethna and colleagues (28) reported that the choice of murine Vβ segments varies with age. These differences can be attributed to selection events. Indeed, it has been shown that differences in thymic selection in young *vs.* adult mice skew the TCR repertoire (29). Another explanation could be epigenetic, as it has been shown that the selection of gene segments for V(D)J recombination depends on chromatin conformation (25) and that epigenetic changes control recombinase recruitment (30).

Concerning the effects of chronic exposure to unpredictable mild socioenvironmental stressors during gestation on newborn TCR-β repertoire, we noted that the core TCR-β repertoire is not affected by CUMS, whereas the minor TCR-β repertoire, representing 25% of the global repertoire, is sensitive to this combination of socioenvironmental stressors. This observation strongly suggests, in agreement with Wooldridge *et al.* (31), that the core repertoire is important for newborn immunity. Furthermore, we previously showed that hypergravity exposure during murine development modified 85% of the TCR-β repertoire (11), and it appears that socio-environmental stressors have less impact on this repertoire than gravity changes.

In a search for an explanation for CUMS-induced minor repertoire changes, we examined imprints left by enzymes involved in V(D)J recombination. However, analyses of deleted nucleotides at segment ends and of palindromes and nongenomic added nucleotides did not highlight alterations of this genetic process. Ward *et al.* (32) deduced a similar conclusion from their study of the Ig repertoire of 35-wk-old unimmunized mice that were sent on a short trip and stay on the International Space Station. Note that this conclusion does not preclude that differences in repertoires could not be seen upon antigen challenge. Changes in DNA accessibility could explain CUMS-induced changes. Indeed, epigenetic modifications are sensitive to stressing events, considering that it was shown that early life events interfere with normal developmental evolution of DNA methylation profile in T cells (33). Furthermore, it was shown that chromatin structure impacts segment usage, that recognition of recombination signals and RAG efficacy require the eviction of 2 histones (H2a and H2b) and that RAG-2 recognizes lysine 4 trimethylation on histone H3 before initiating V(D)J recombination (25, 34, 35).

Finally, to evaluate the potential impact of minor repertoire changes on host immunity, we searched for CDR3β associated with different immune reactions in our sets of sequences. This study revealed that the neonatal repertoire contains self-reactive CDR3 and that the frequency of these CDR3 is higher in the minor repertoire of CUMS pups. Previous studies have demonstrated that the neonatal TCR-β repertoire has cross-reactive properties (29). Wooldridge *et al.* (31) suggested that a high level of receptor degeneracy, enabling each TCR to recognize multiple peptides, developed during evolution. According to that group, this recognition would allow the limited peripheral T-cell compartment to successfully provide immunity to the vast array of possible different peptides. Our analysis of CDR3 amino acid composition (**Fig. 7**) supports this hypothesis; it revealed an overrepresentation of glycine residues, known to be associated with conformational plasticity/flexibility, in these regions implicated in antigenic peptide recognition. This glycine-based plasticity is also present in antibodies from lower vertebrates, supported by the finding that amphibian IgM heavy chain CDR3s contain 1.6–2.2 times more Gly than corresponding murine CDR3s (36).

In summary, despite the fact that CUMS involves only mild socioenvironmental stressors and does not modify the number of cells at the various stages of T lymphopoiesis or TCR expression on neonate thymocytes, it affects the minor TCR-β repertoire representing 25% of the global repertoire and increases the frequency of self-reactive CDR3 in that repertoire. This observation will deserve further investigation because, during prolonged missions (to Mars, asteroids, and other destinations), more prolonged-development diseases such as autoimmunity could occur (4). To precisely determine the consequences of these changes on host immunity, it will be necessary to determine whether CUMS exposure during gestation influences TCR-β repertoire diversity and immune responses of offspring at an adult age. Several studies have evidenced stress-induced brain epigenetic imprinting and have shown the long-term impact of prenatal stress exposure on offspring behavior (reviewed in ref. 37). It is therefore conceivable that such imprinting exists for immune cells, as well. Finally, the results of this study go beyond astronaut health protection because the CUMS model can also be used to study the impact of stressors encoutered in everyday life, and it is now well established that stress can contribute to the development, or aggravation of several diseases (38). FJ

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank T. Marday, N. Boggetto, and G. Wentzinger for efficient technical support and assistance. This work was supported by the French Space Agency (Grants DAR 4800000894 and 4800000950), the French Ministry of Higher Education and Research, the Université de Lorraine, the Région Lorraine, and INSERM; the Stress Immunity Pathogens Laboratory received support from the Impact Biomolecules Project of the Lorraine Université d'Excellence (Investissements d'Avenir; ANR 15-004). The study was supported by the ImagoSeine Core Facility of the Institut Jacques Monod, a member of France BioImaging (ANR-10.INBS-04), and La Ligue Contre le Cancer (R03/75-79). The authors declare no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C. Cohen-Salmon, S. Ghislin, and J.-P. Frippiat designed the research; C. Fonte, S. Kaminski, L. Lanfumey, and S. Ghislin performed the experiments; A. Vanet conceived the specific software required for the project; C. Fonte, S. Kaminski, A. Vanet, and S. Ghislin analyzed the data; and C. Fonte, S. Ghislin, and J.-P. Frippiat wrote the manuscript, in conjunction with other authors.

REFERENCES

1. Guéguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J. L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C., and Frippiat, J. P. (2009)

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond earth's orbit? *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1027–1038
2. Frippiat, J. P., Crucian, B. E., de Quervain, D. J., Grimm, D., Montano, N., Praun, S., Roozendaal, B., Schelling, G., Thiel, M., Ullrich, O., and Choukèr, A. (2016) Towards human exploration of space: the THESEUS review series on immunology research priorities. *NPJ Microgravity* **2**, 16040
3. Kimzey, S. L. (1977) Hematology and immunology studies. In *Biomedical Results from Skylab* (Johnson, R. S., and and Dietlein, L. F., eds.), pp. 248–282, National Aeronautics and Space Administration, Washington, DC
4. Crucian, B., Babiak-Vazquez, A., Johnston, S., Pierson, D. L., Ott, C. M., and Sams, C. (2016) Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *Int. J. Gen. Med.* **9**, 383–391
5. Vacek, A., Michurina, T. V., Serova, L. V., Rotkovská, D., and Bartonícková, 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
6. 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
7. 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
8. Ortega, M. T., Pecaut, M. J., Gridley, D. S., Stodieck, L. S., Ferguson, V., and Chapes, S. K. (2009) Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **106**, 548–555
9. Lescale, C., Schenten, V., Djeghloul, D., Bennabi, M., Gaignier, F., Vandamme, K., Strazielle, C., Kuzniak, I., Petite, H., Dosquet, C., Frippiat, J. P., and Goodhardt, M. (2015) Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. *FASEB J.* **29**, 455–463
10. Woods, C. C., Banks, K. E., Gruener, R., and DeLuca, D. (2003) Loss of T cell precursors after spaceflight and exposure to vector-averaged gravity. *FASEB J.* **17**, 1526–1528
11. Ghislin, S., Ouzren-Zarhloul, N., Kaminski, S., and Frippiat, J. P. (2015) Hypergravity exposure during gestation modifies the TCRβ repertoire of newborn mice. *Sci. Rep.* **5**, 9318
12. Morahan, G., Malcolm, L., and Miller, J. F. (1987) Expression of T cell antigen receptor and immunoglobulin genes in lymphoid organs visualized by in situ hybridization. *EMBO J.* **6**, 3679–3685
13. Hunter, M. C., Teijeira, A., and Halin, C. (2016) T cell trafficking through lymphatic vessels. *Front. Immunol.* **7**, 613
14. Schatz, D. G., and Swanson, P. C. (2011) V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 167–202
15. Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M. R. (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**, 781–794
16. Gaignier, F., Legrand-Frossi, C., Stragier, E., Mathiot, J., Merlin, J. L., Cohen-Salmon, C., Lanfumey, L., and Frippiat, J. P. (2018) A model of chronic exposure to unpredictable mild socio-environmental stressors replicates some spaceflight-induced immunological changes. *Front. Physiol.* **9**, 514
17. Pardon, M., Gérardin, P., Joubert, C., Pérez-Diaz, F., and Cohen-Salmon, C. (2000) Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal pup care behavior in mice. *Biol. Psychiatry* **47**, 858–863
18. Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Schenten, V., Bascove, M., Koch, G. 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
19. Alamyar, E., Duroux, P., Lefranc, M.-P., and Giudicelli, V. (2012) IMGT® tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. In *Immunogenetics* (Christiansen, F. T., and and Tait, B. D., eds.), **Vol. 882**, pp. 569–604, Humana Press, Totowa, NJ, USA
20. Taves, M. D., Hamden, J. E., and Soma, K. K. (2017) Local glucocorticoid production in lymphoid organs of mice and birds: functions in lymphocyte development. *Horm. Behav.* **88**, 4–14
21. Madi, A., Shifrut, E., Reich-Zeliger, S., Gal, H., Best, K., Ndifon, W., Chain, B., Cohen, I. R., and Friedman, N. (2014) T-cell receptor repertoires share a restricted set of public and abundant CDR3 sequences that are associated with self-related immunity. *Genome Res.* **24**, 1603–1612
22. Misdrahi, D., Pardon, M. C., Pérez-Diaz, F., Hanoun, N., and Cohen-Salmon, C. (2005) Prepartum chronic ultramild stress increases corticosterone and estradiol levels in gestating mice: implications for postpartum depressive disorders. *Psychiatry Res.* **137**, 123–130
23. Rangon, C. M., Fortes, S., Lelièvre, V., Leroux, P., Plaisant, F., Joubert, C., Lanfumey, L., Cohen-Salmon, C., and Gressens, P. (2007) Chronic mild stress during gestation worsens neonatal brain lesions in mice. *J. Neurosci.* **27**, 7532–7540
24. Candéias, S., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1991) The V beta 17+ T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4+ versus CD8+ cells. *J. Exp. Med.* **174**, 989–1000
25. Ndifon, W., Gal, H., Shifrut, E., Aharoni, R., Yissachar, N., Waysbort, N., Reich-Zeliger, S., Arnon, R., and Friedman, N. (2012) Chromatin conformation governs T-cell receptor Jβ gene segment usage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 15865–15870
26. Madi, A., Poran, A., Shifrut, E., Reich-Zeliger, S., Greenstein, E., Zaretsky, I., Arnon, T., Laethem, F. V., Singer, A., Lu, J., Sun, P. D., Cohen, I. R., and Friedman, N. (2017) T cell receptor repertoires of mice and humans are clustered in similarity networks around conserved public CDR3 sequences. *Elife* **6**, 22057
27. Murray, J. M., Messier, T., Rivers, J., O'Neill, J. P., Walker, V. E., Vacek, P. M., and Finette, B. A. (2012) VDJ recombinase-mediated TCR β locus gene usage and coding joint processing in peripheral T cells during perinatal and pediatric development. *J. Immunol.* **189**, 2356–2364
28. Sethna, Z., Elhanati, Y., Dudgeon, C. S., Callan, C. G., Jr., Levine, A. J., Mora, T., and Walczak, A. M. (2017) Insights into immune system development and function from mouse T-cell repertoires. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 2253–2258
29. Dong, M., Artusa, P., Kelly, S. A., Fournier, M., Baldwin, T. A., Mandl, J. N., and Melichar, H. J. (2017) Alterations in the thymic selection threshold skew the self-reactivity of the TCR repertoire in neonates. *J. Immunol.* **199**, 965–973
30. Subrahmanyam, R., Du, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Ji, Y., Zhang, Y., Alt, F. W., Schatz, D. G., and Sen, R. (2012) Localized epigenetic changes induced by DH recombination restricts recombinase to DJH junctions. *Nat. Immunol.* **13**, 1205–1212
31. Wooldridge, L., Ekeruche-Makinde, J., van den Berg, H. A., Skowera, A., Miles, J. J., Tan, M. P., Dolton, G., Clement, M., Llewellyn-Lacey, S., Price, D. A., Peakman, M., and Sewell, A. K. (2012) A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J. Biol. Chem.* **287**, 1168–1177
32. Ward, C., Rettig, T. A., Hlavacek, S., Bye, B. A., Pecaut, M. J., and Chapes, S. K. (2018) Effects of spaceflight on the immunoglobulin repertoire of unimmunized C57BL/6 mice. *Life Sci. Space Res. (Amst.)* **16**, 63–75
33. Massart, R., Nemoda, Z., Suderman, M. J., Sutti, S., Ruggiero, A. M., Dettmer, A. M., Suomi, S. J., and Szyf, M. (2016) Early life adversity alters normal sex-dependent developmental dynamics of DNA methylation. *Dev. Psychopathol.* **28**, 1259–1272
34. Matthews, A. G., Kuo, A. J., Ramón-Maiques, S., Han, S., Champagne, K. S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D., Cheung, P., Ciccone, D. N., Walter, K. L., Utz, P. J., Shi, Y., Kutateladze, T. G., Yang, W., Gozani, O., and Oettinger, M. A. (2007) RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* **450**, 1106–1110
35. Bevington, S., and Boyes, J. (2013) Transcription-coupled eviction of histones H2A/H2B governs V(D)J recombination. *EMBO J.* **32**, 1381–1392
36. Fonte, C., Gruez, A., Ghislin, S., and Frippiat, J. P. (2015) The urodele amphibian *Pleurodeles waltl* has a diverse repertoire of immunoglobulin heavy chains with polyreactive and species-specific features. *Dev. Comp. Immunol.* **53**, 371–384
37. Bale, T. L. (2015) Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 332–344
38. Glaser, R., and Kiecolt-Glaser, J. K. (2005) Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 243–251
39. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., and Brenner, S. E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190

Received for publication May 16, 2018.
Accepted for publication July 9, 2018.

www.fasebj.org by Tufts Univ Health Sciences Library (130.64.11.153) on July 30, 2018. The FASEB Journal Vol. ${article.issue.getVolume()}, No. ${article.issue.getIssueNumber()}

CHAPITRE IV : EFFETS DE L'HYPOKINESIE DES MEMBRES POSTERIEURS ET DU VIEILLISSEMENT SUR LA DIVERSITE DU REPERTOIRE BCR MURIN

Figure 25: Photographie d'une souris soumise au modèle de suspension anti-orthostatique.

Les souris soumises au modèle de suspension anti-orthostatique sont attachées par la queue. Une inclinaison d'environ 30° entre le tronc et le sol est appliquée de sorte que seuls les membres antérieurs touchent la grille au fond de la cage.

1- INTRODUCTION

1.1- Le modèle HU : un modèle animal validé pour étudier les modifications physiologiques engendrées par les vols spatiaux

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les vols spatiaux sont source de stress et peuvent induire des modifications importantes au niveau du système immunitaire adaptatif. La difficulté à réaliser des expérimentations en vol, notamment pour des études mécanistiques, a conduit au développement de modèles terrestres permettant de mimer une partie des perturbations rencontrées en vol. Le système de suspension anti-orthostatique (ou HU pour « Hindlimb Unolading ») fait partie de ces modèles.

Celui-ci correspond à un modèle de micropesanteur simulée, mis au point sur des rats dans les années 70 par la NASA et qui est actuellement couramment utilisé avec des rats et des souris (E. Morey-Holton et al. 2005). Il consiste à attacher les rongeurs par la queue à un système de poulie de manière à ce que leurs pattes postérieures ne touchent plus le sol, qu'elles ne supportent aucunes charges et qu'il y ait une inclinaison d'environ 30°C entre le tronc de l'animal et le sol (Figure 25) (E. R. Morey-Holton and Globus 2002). Bien qu'il ne soit pas parfait, le modèle HU permet de reproduire sur Terre de nombreuses modifications physiologiques similaires à celles observées chez des astronautes après un vol spatial comme la diminution de la masse musculaire, la diminution du volume osseux des membres postérieurs, une redistribution des fluides corporels vers la tête ainsi qu'une altération de la réponse du système immunitaire qui se caractérise notamment par une diminution de la résistance aux bactéries (G. Sonnenfeld 2003; Gerald Sonnenfeld 2005; E. Morey-Holton et al. 2005; M. Li et al. 2014).

1.2- Effets du modèle HU sur le système immunitaire adaptatif

Le modèle HU engendre de nombreuses modifications des systèmes immunitaires inné et adaptatif qui ne sont pas sans conséquence sur l'efficacité du système immunitaire vis-à-vis d'agents infectieux. En effet, plusieurs études ont montré une diminution de la résistance des animaux HU aux infections bactériennes de type Gram- associée à une augmentation de la morbidité (Belay et al. 2002; Aviles et al. 2003; M. Li et al. 2014).

		Références bibliographiques	
	Effets sur le système immunitaire	HU	Vieillissement
Immunité innée	↘ de la production des cytokines IFN-α et IFN-β (action antivirale)	G. Sonnenfeld et al. 1982	Agrawal and Gupta 2011
	↘ fonction des macrophages	Kohno et al. 2012	Murciano et al. 2008
	↘ pouvoir phagocytaire des neutrophiles	Fleming, Rosenkrans, and Chapes 1990	Wenisch et al. 2000; Fulop et al. 2004; Nomellini et al. 2008
Immunité adaptative	involution du thymus	Steffen and Musacchia 1986	Gui et al. 2012
	atrophie splénique	Caren, Mandel, and Nunes 1980	Aw et al. 2016; Turner and Mabbott 2017
	↘ de la prolifération des LT et des LB circulants en réponse à des mitogènes	Nash 1991	Douziech et al. 2002; Frasca and Blomberg 2009
	↘ de la capacité à répondre aux infections	Li et al. 2014	Gavazzi and Krause 2002

Tableau 6: Effets similaires du modèle HU et du vieillissement sur l'immunité innée et adaptative.

Dans le cas du système immunitaire adaptatif, il a été montré que la suspension anti-orthostatique engendre une involution du thymus (Steffen and Musacchia 1986) ainsi qu'une atrophie splénique (Caren, Mandel, and Nunes 1980) qui se traduisent par une diminution de plus de 50% du nombre de thymocytes et de lymphocytes T et B spléniques (L. X. Wei et al. 2003). De plus, notre équipe a montré que le modèle HU impacte de manière plus importante les LB spléniques (avec une diminution de plus de 60%) que les LT, engendrant ainsi une modification de la proportion des sous-populations spléniques qui se traduit par une diminution de plus de deux fois du rapport LB/LT comparé aux souris témoins (Gaignier et al. 2014). Par ailleurs, une autre étude a révélé une baisse de la réponse proliférative *in vitro* des LT et des LB circulants en réponse à des mitogènes, d'environ 50 % pour les lymphocytes T et d'environ 30% pour les LB chez les rats HU (Nash 1991). Enfin, ce modèle a été montré comme impactant la lymphopoïèse B, plus précisément les stades pro-B, pré-B et B immature (Lescale et al. 2015).

1.3- Objectifs de l'étude : Le modèle HU peut-il être considéré comme un modèle d'immunosénescence ?

Comme nous l'avons vu, le modèle HU induit une atrophie musculaire et une réduction du volume osseux. Ces deux phénomènes sont observés chez les personnes ayant un mode de vie sédentaire (Herrmann et al. 2015; Alghadir, Gabr, and Al-Eisa 2015) et chez les personnes âgées. De façon intéressante, plusieurs effets similaires, résumés dans le tableau 6[i], ont été mis en évidence entre le vieillissement et le modèle HU. De plus, nos travaux menés en collaboration avec l'unité INSERM UMRS940 (Paris), sur des souris C57BL/6 mâles âgées de 3 mois soumises pendant 21 jours à une suspension anti-orthostatique, ont mis en évidence une modification de la structure osseuse des souris HU similaire à celle observée chez des souris âgées, à savoir une diminution du volume osseux et du nombre de travées osseuses dans le tibia (Lescale et al. 2015). Cette étude a également révélé chez les souris HU, une diminution de la signalisation par le récepteur à l'IL-7 (essentiel à la différenciation des LB) associée à des altérations de la lymphopoïèse B, une fois encore similaire à celles observées chez les souris âgées (Lescale et al. 2015). Plus précisément, cette étude a montré une diminution des cellules aux stades pro-B et pré-B, stades durant lesquels se produit le réarrangement génique de la chaîne lourde des Ig. Ces résultats suggèrent donc que le processus de recombinaison V(D)J

responsable de la diversité du répertoire d'anticorps pourrait être affecté aussi bien par la suspension orthostatique que par le vieillissement. L'étude du répertoire d'anticorps de cellules B spléniques et périphériques chez des individus âgés, qui s'est révélé être modifié et moins diversifié au cours du vieillissement, a fait l'objet de plusieurs publications (S. C. Riley et al. 1989; van Dijk-Härd et al. 1997; X. Wang and Stollar 1999; Kolar et al. 2006; Cancro et al. 2009). En revanche, à notre connaissance, aucune étude n'a abordé l'impact du vieillissement sur la constitution du répertoire des Ig au sein de la moelle osseuse. De même, aucune étude ne s'est penchée sur l'effet du modèle HU sur la diversité du répertoire des Ig. Le but de notre étude a donc été de savoir si le processus de recombinaison V(D)J et la diversité du répertoire de chaînes lourdes d'IgM des cellules B de la moelle osseuse étaient affectés aussi bien par la suspension orthostatique que par le vieillissement, afin de déterminer si le modèle HU pourrait être utilisé comme un modèle de vieillissement accéléré. Pour cela, nous avons analysé l'expression des effecteurs de la recombinaison V(D)J, ainsi que le répertoire de chaînes lourdes d'IgM provenant de cellules de moelle osseuse de souris HU, âgées et contrôles. Pour analyser le répertoire d'anticorps, nous avons créé une banque d'ADNc de transcrits de chaîne lourde d'IgM à partir des cellules de la moelle osseuse des différents groupes de souris qui a ensuite été séquencée par séquençage haut débit. Les données de séquençage ont été analysées à l'aide du logiciel IMGT / High V-quest (Alamyar et al., 2012) ainsi que d'un logiciel spécialement conçu pour ce projet.

2- MATERIELS ET METHODES

2.1- Animaux

Les expérimentations ont été réalisées avec des souris C57BL/6J mâles âgées de 14 semaines (souris témoins et HU) à 18 mois (souris âgées) (Charles River Laboratories, France). A leur arrivée au laboratoire, les animaux ont été placés en groupe de deux ou trois par cage standard durant plus de 8 semaines avant d'être isolées de façon aléatoire pour les expérimentations. Les animaux ont été logés dans des cages standards en plexiglas transparent (longueur : 30 cm, largeur : 11 cm, hauteur : 12 cm), placées dans des armoires ventilées (A-box, Noroit, France) et maintenues dans des conditions standard de luminosité (cycles de 12 h de lumière / 12 h d'obscurité) avec une température constante (22 ° C), une

humidité relative de 50% et un libre accès à la nourriture et à l'eau. Les expérimentations *in vivo* ont été conduites selon les directives de l'Union européenne (2010/63/UE). De plus, le protocole a été approuvé par le Comité d'Ethique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale (n° d'agrément : CELMEA-2012-0008).

2.2- Suspension anti-orthostatique

Deux expériences de suspension comprenant chacune 30 souris ont été réalisées. Pour la première expérience, nous avons divisé les souris en trois groupes de 10 souris : un groupe de souris contrôles (placées seules dans des cages standard), un groupe de souris attachées (attachées mais pas suspendues) et un groupe de souris suspendues ou HU placées seules dans des cages fabriquées selon Chapes et al (longueur : 30 cm, largeur : 11 cm, hauteur : 26 cm) (Chapes et al. 1993). N'ayant observé aucunes différences dans nos analyses entre le groupe de souris contrôles et le groupe de souris attachées, nous avons décidé, pour la deuxième expérience, de diviser les 30 souris en deux groupes : 15 souris contrôles et 15 souris HU. L'angle de suspension pour les souris HU a été ajusté à 25-30 ° de sorte que seuls les membres antérieurs touchent la grille au fond de la cage. Le protocole de suspension a duré 21 jours.

2.3- Recueil des échantillons

A la fin de l'expérimentation, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane et mises à mort par dislocation cervicale entre 8h et 10h pour éviter les fluctuations de corticostérone dues au rythme circadien. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque et laissé coaguler à température ambiante pendant 15 minutes. Le sérum a été recueilli après une centrifugation à 4000 tr/min à 4 ° C pendant 20 minutes et conservé à -80 ° C. La moelle osseuse a été recueillie à partir des tibias et fémurs des souris. Les hématies contenues dans la moelle osseuse ont été lysées à l'aide du tampon RGB pendant 2 min (eBioscience, France). 10 mL de PBS-SVF 2% ont été ensuite ajoutés et les cellules centrifugées à 1600 rpm pendant 5 min à 4°C. Les cellules ont été re-suspendues dans 5mL de PBS-SVF 2% puis comptées à l'aide du compteur Scepter ™ 2.0 (Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

2.4- Quantification de la corticostérone

La corticostérone a été quantifiée à partir des échantillons de sérum par test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) selon les instructions du kit « DetectX Corticosterone Enzyme Immunoassay» (Arbor assays, Euromedex, France). Tous les échantillons ont été analysés en duplicat. L'absorbance à 405 nm a été mesurée grâce à un lecteur de plaque (WALLAC 1420 VICTOR2 microplate reader) et les concentrations, exprimées en ng/ml.

2.5- Cytométrie en flux

5 x 10^5 cellules de moelle osseuse ont été marquées à l'aide des anticorps suivant : anti–B220-PE (RA3-6B2 ; Ozyme, France), anti–CD43-FITC (S7 ; BD Biosciences, France), anti–CD19-APC-Cy7 (1D3 ; Ozyme, France), anti–IgM-PE-Cy7 (R6-60.2 ; BD Biosciences, France). Ces marqueurs ont permis d'identifier les sous-populations de lymphocytes B comme suit : pro-B (CD19+/B220 low/CD43+/IgM-), pré-B (CD19+/B220 low/CD43-/IgM-), B immatures (CD19+/B220 low/CD43-/IgM+) et B matures (CD19+/B220 high/CD43+/IgM+). Les cellules ont ensuite été fixées et perméabilisées à l'aide du kit BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, France), puis incubées pendant 1h en présence soit d'un anticorps anti-EZH2 (AP2512d, Clinisciences, France), soit d'un anticorps anti-H3K27me3 (Merck Millipore, France), soit d'un anticorps anti-H3K9me2 (Active Motif, France). Les cellules ont été lavées puis incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin Pacific Blue (ThermoFisher, France) et enfin lavées. L'acquisition des résultats a été réalisée sur le cytomètre en flux Gallios (Beckmann and Coulters, France) au sein de l'Unité Mixte de Service 2008. L'analyse des données a été réalisée grâce au logiciel FlowJo®(Tree Star Inc, OR, USA).

2.6- Transcription inverse et PCR quantitative

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 10^7 cellules de moelle osseuse suivant les instructions du kit Nucleospin® RNA plus (Macherey Nagel, Hoerdt, France). La transcription inverse a été réalisée à l'aide de Random primers, de RNase OUT et de la transcriptase inverse MMLV (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Expérience	Cibles	Séquences des oligonucléotides	Taille fragment (pb)	Température hybridation (°C)
qPCR	Ef1a	S:5' AGAACCAGGCCAGAACCGAA 3'	183	60,8
		AS: 5' GCAGCTGAGACTCCTTTCCA 3'		
	GUSB	S: CCGATTATCCAGAGCGAGT	197	60,8
		AS: CTCAGCGGTGACTGGTTCG		
	TBP	S: CAAACCCAGAATTGTTCT	131	58
		AS: ATGTGGTCTTCCTGAATCCCT		
	RAG 1	S: 5'-GGCTCAGTCTACATCTGTACA- 3'	143	59,2
		AS: 5'-ACGGACTCATGATACGGATTG- 3'		
	TdT	S1: 5'-CGAAGACCTCGTTAGCTGTG-3'	140	60,8
		AS: 5'-TCATGTCCAGTCATCTTACCC- 3'		
	Artemis	S2: 5'-CTAGGAGTCCGCACCACGT- 3'	147	60
		AS: 5'-GGTGCAGGATATCAGGCATG- 3'		
	PAX5	S: 5'-GCGTGTTTGAGAGACAGCAC-3'		60
		AS: 5'-GGCTCGTCAAGTTGGCTTTC-3'		
5'RACE PCR	GSP1	5'-GAAGGAAATGGTGCTGGGCAGGAAGTCC-3'	600-650	68
	UPM	5'-CTAATACGATCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'		
	GSP2	5'-TACACGACGCTCTTCCGATCTAGACAGGGGGCTCTCGCAGGAGACGA-3'		
	NUP	5'-AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'		

Tableau 7: Oligonucléotides utilisés pour réaliser les qPCR et les 5'RACE PCR.

Pour chaque couple d'amorces sont indiquées la séquence, la taille de l'amplification et la température d'hybridation.

L'évaluation des variations d'expression de RAG1, TdT, Artemis et Pax5 a été réalisée par qPCR à l'aide du Takyon No ROX SYBR 2X MasterMix bleu dTTP (Eurogentec, Angers, France) et de la qPCR Mastercycler® realplex2 (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Le programme de PCR utilisé était : 3 min à 95 °C, suivies de 40 cycles de 15 sec à 95 °C et de 45 sec à la température d'hybridation spécifique pour chaque couple d'oligonucléotides indiquée dans le tableau 7. Ensuite, une courbe de fusion a été réalisée afin de s'assurer de la qualité de l'amplification. Chaque amplification a été réalisée en triplicat. La quantification relative des ARN d'intérêts a été réalisée par normalisation par rapport à 3 ARN de références (Ef1a, GUSB et TBP) selon le modèle de Pfaffl (Pfaffl et al. 2004).

2.7- Séquençage Illumina

Pour chaque groupe de souris, quatre sous-groupes de cinq souris choisies aléatoirement ont été créés. 200 ng d'ARN total extrait de cellules de moelle osseuse ont été mélangés au sein de chaque sous-groupe. A partir de ces pools d'ARN, la transcription inverse a été réalisée selon les instructions du kit SMARTer™ RACE (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Les ADNc codant les chaînes lourdes d'IgM ont ensuite été amplifiés par 5'RACE PCR à l'aide du kit SMARTer™ RACE. Les oligonucléotides, GSP1 et GSP2, spécifiques des chaînes lourdes ont été définis dans la région constante des IgM (Tableau 7). La première PCR a été réalisée à l'aide des oligonucléotides UPM (fourni dans le kit) et GSP1. La seconde PCR, réalisée à partir d'une dilution de la PCR précédente, a nécessité l'utilisation des oligonucléotides NUP (fourni dans le kit) et GSP2. Les produits de PCR ainsi obtenus ont été séparés sur un gel d'agarose. Les fragments correspondant à la taille attendue (600-650pb) ont été purifiés à l'aide du kit Nucleospin® Gel et PCR Clean-up (Macherey Nagel, Hoerdt, France). Finalement, une troisième PCR a été réalisée sur une dilution de la purification, pour créer les banques d'ADNc en utilisant des amorces adaptatrices de chez Illumina (NEBNext® Index Primer pour Illumina). Les ADNc ainsi obtenus ont été séquencés en bidirectionnel à l'aide d'un MiSeq Illumina de l'UMS 2008 (Vandœuvre-lès-Nancy, France). Les données de séquençage ont été analysées à l'aide du logiciel IMGT / High V-quest (Alamyar et al. 2012) (http://www.imgt.org).

2.8- Logiciel dédié à l'analyse de séquences VDJ

Un logiciel écrit en Perl, un langage d'édition efficace, a été créé pour calculer les paramètres nécessaires à nos études. Ce logiciel analysait seize fichiers différents, correspondant à seize échantillons différents, produits par IMGT / High V-quest. Pour éliminer les potentiels biais de PCR et les expansions clonales, seules les séquences uniques avec un CDR3 productif ont servi à l'analyse. A partir de cet ensemble de résultats, il a été calculé : la fréquence de chaque segment VH, D et JH ; le nombre de nucléotides manquants des deux côtés des segments D ainsi qu'aux extrémités 3'-VH et 5'-JH ; le nombre de séquences ayant des nucléotides non génomiques ajoutés au niveau des jonctions ; les fréquences des palindromes aux jonctions V-D et D-J et la taille des CDR3.

2.9- Statistiques

Les résultats des souris contrôles ont d'abord été comparés à ceux des souris attachées pour vérifier que l'attache n'impacte pas les résultats. Les résultats des souris contrôles ont ensuite été comparés à ceux des souris HU pour voir l'effet du traitement. Le logiciel StatView (SAS Institute Inc, Cary, Caroline du Nord, États-Unis) a été utilisé pour effectuer l'analyse statistique des concentrations sériques de corticostérone, des résultats de RT-qPCR, des analyses de cytométrie en flux et des analyses de séquençage haut débit. L'homogénéité de la variance a été déterminée en utilisant le test de Fisher et la normalité de la distribution a été déterminée en utilisant le test de Kolmogorov-Smirnov. Lorsque l'homogénéité des variances et des distributions étaient observées, le test T de Student a été effectué. Lorsque la variance et la distribution n'étaient pas homogènes, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été effectué. Les p-values <0,05 indiquent une significativité. Pour tous les résultats, les moyennes ± SEM sont présentées sauf pour les analyses du répertoire qui sont présentées avec les moyennes ± écart-type.

2.10- Indices de dissimilarité

Des indices de dissimilarité ont été utilisés pour déterminer si des variations existent entre les groupes lors de l'analyse du répertoire BCR. La formule suivante montre, par exemple,

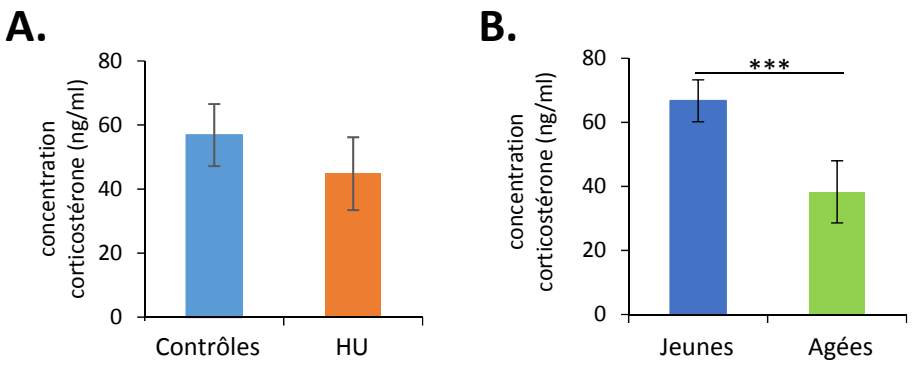


Figure 26: Evaluation du stress chez les souris HU et âgées

Quantification de la concentration en corticostérone sérique par ELISA à partir des sérums des souris HU (n=10) comparés aux souris témoins (n=10) (A), ainsi que des sérums des souris âgées (n=19) comparés aux souris jeunes (n=19) (B).

Les SEM sont représentés sur les graphiques. Analyse statistique: *** : $p < 0,001$.

comment ont été calculés ces indices (I) pour l'expression des différents segments géniques VH entre le groupe jeune (J) et âgé (A):

$$I\,(\text{groupe A - groupe J}) = 0{,}5 * \sum_{i=1}^{n} |\,F\text{ segment i du groupe A - F segment i du groupe J})\,|$$

Où F est la fréquence d'un segment V donné dans un groupe d'animaux et n est le nombre de segments V présents dans le locus IgH murin situé sur le chromosome 12.

Dans ce calcul, afin d'évaluer la variabilité interindividuelle dans les groupes témoins (jeunes pour les souris âgées et contrôles pour les souris HU), chaque point pour chaque segment a été comparé à la moyenne des quatre valeurs des témoins pour le même segment.

Ces indices sont compris entre 0 et 1. Nous avons comparé les indices des groupes HU et âgés avec leurs témoins respectifs pour évaluer les effets de l'exposition à la suspension anti-orthostatique et du vieillissement.

3- RESULTATS

3.1- Evaluation du stress chez les souris HU et âgées

Afin d'évaluer l'état de stress des souris âgées et HU à la fin des 21 jours d'expérimentation, nous avons mesuré la concentration de corticostérone sérique par ELISA. Aucune différence significative n'a été relevée entre les souris contrôles et HU (Figure 26A), alors qu'on observe une diminution significative de la concentration de corticostérone sérique chez les souris âgées comparées au souris jeunes (Figure 26B). Il est intéressant de noter que l'analyse statistique de la concentration de corticostérone entre les souris contrôles et jeunes n'a révélé aucune différence significative montrant ainsi la reproductibilité de nos analyses. Ces résultats indiquent que les souris HU se sont adaptées aux conditions anti-orthostatiques et que nos souris âgées ne présentaient aucun état de stress.

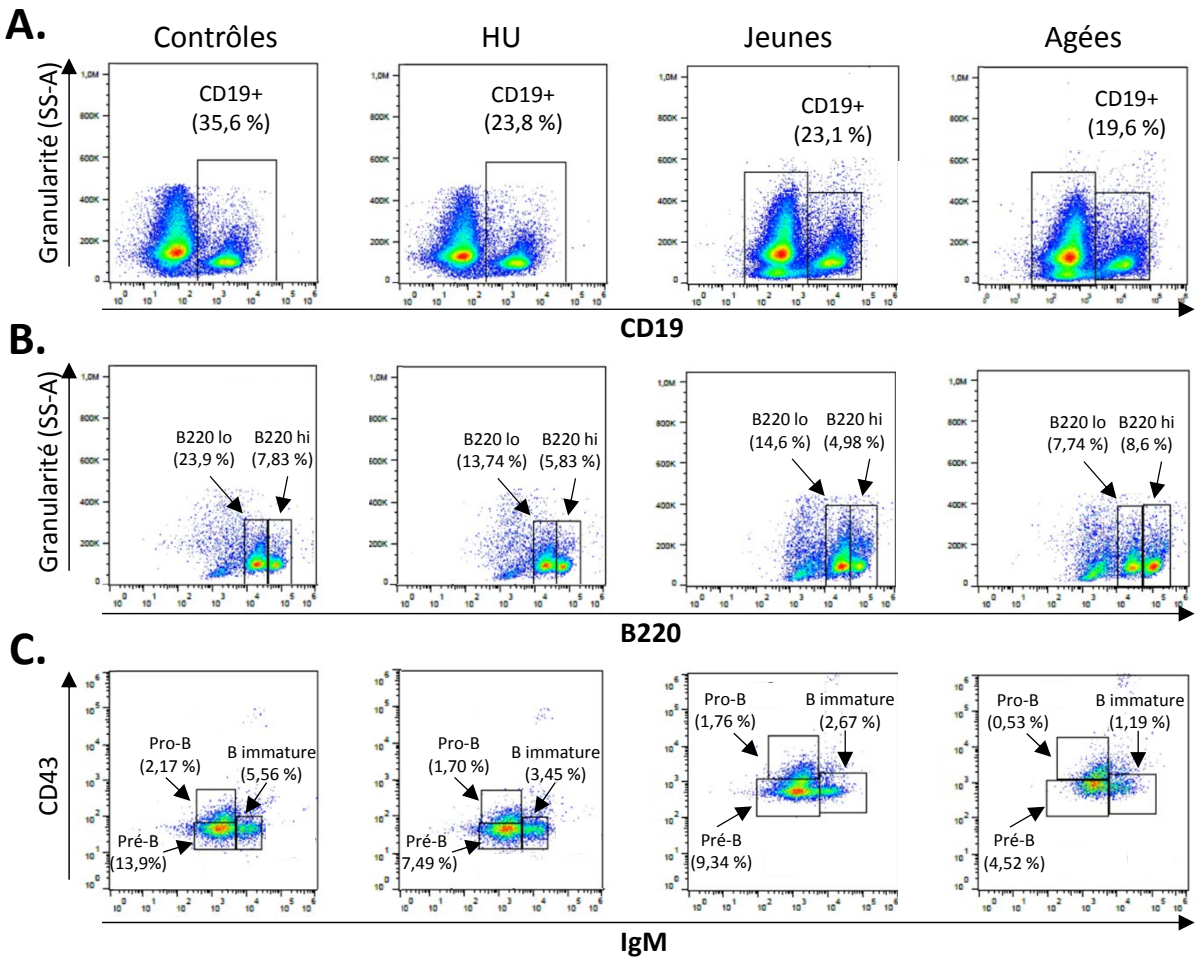


Figure 27: Exemple de résultats obtenus par cytométrie en flux pour l'analyse des différentes populations de cellules B au cours de leur maturation.

Les LB ont été isolés à partir de la moelle osseuse des tibias et fémurs des souris. Les sous-population ont été définies comme suit : pro-B (CD19+/B220 low/CD43+/IgM-), pré-B (CD19+/B220 low/CD43-/IgM-), B immatures (CD19+/B220 low/CD43-/IgM+) et B matures (CD19+/B220 high/CD43+/IgM+). Les populations de lymphocytes ont été déterminées comme dans les quatre exemples présentés ici. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux pourcentages de chaque population de cellules parmi les cellules de la moelle osseuse totale.

A. Sélection des lymphocytes CD19+ parmi les cellules viables totales de la moelle osseuse grâce au profil taille/granulosité.

B. Parmi la population des lymphocytes CD19+, nous avons distingué deux populations en fonction de l'intensité du marquage B220, les cellules B B220 lo (faible marquage B220) et les cellules B220 hi (fort marquage B220). La population B220 hi contient une seule population, les LB matures (non montrée ici). La population B220 lo contient les populations pro-B, pré-B et B immatures.

C. Parmi la population de lymphocytes B220 lo on peut distinguer, en fonction de l'expression de CD43 et d'IgM, les populations pro-B (CD43+/IgM-), pré-B (CD43-/IgM-) et B immatures (CD43-/IgM+).

3.2- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur la lymphopoïèse B

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'impact de la suspension anti-orthostatique (HU) et du vieillissement sur la lymphopoïèse B par cytométrie en flux. Une première analyse globale des cellules CD19+ (permettant de détecter les cellules pro-B à B mature) nous a permis de mettre en évidence une diminution de la proportion de ces cellules dans les deux modèles par rapport à leur contrôle respectif (Figure 27A). Une analyse plus détaillée des différents stades de maturation a également été réalisée à l'aide des marqueurs B220, CD43 et IgM (Figure 27 B et C). Ainsi, comme présenté dans les figures 28 A et B, nous avons observé pour les souris HU et les souris âgées une diminution significative des cellules pro-B et pré-B par rapport à leur groupe contrôle. Pour le stade B immature, une diminution statistiquement significative n'est observée que chez les souris âgées. Pour le stade B mature, la proportion de ces cellules diminue chez les souris HU et augmente chez les souris âgées. Cette dernière différence peut être expliquée par une différence de proportion des cellules au stade B mature entre les groupes contrôles des souris HU et des souris âgées. En effet, les contrôles des souris HU présentent un taux de 8% de B mature tandis que les contrôles des souris âgées (notées jeunes dans les figures) ont un taux de 4%. Malgré cette différence, les résultats obtenus sont globalement en accord avec ceux obtenus par Lescale et al (Lescale et al, 2015).
Ainsi, les stades pro-B et pré-B, transition où a lieu la recombinaison V(D)J de la chaîne lourde des IgM, sont affectés de la même manière dans les deux modèles. Cependant, la diminution des cellules aux stades pro-B à B immatures chez les souris âgées est deux fois plus importante que celle observée chez les souris HU. Ceci suggère que la lymphopoïèse B chez les souris âgées est plus impactée que chez les souris HU.

3.3- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur l'expression des effecteurs de la recombinaison V(D)J

L'étude de la lymphopoïèse B par cytométrie en flux a révélé que le modèle HU et le vieillissement impactent la maturation des cellules B au stade pro-B. Or, c'est à ce stade que débute le réarrangement de la chaîne lourde du BCR. Nous nous sommes donc demandé si les effecteurs de la recombinaison V(D)J étaient impactés par le modèle HU et le vieillissement.

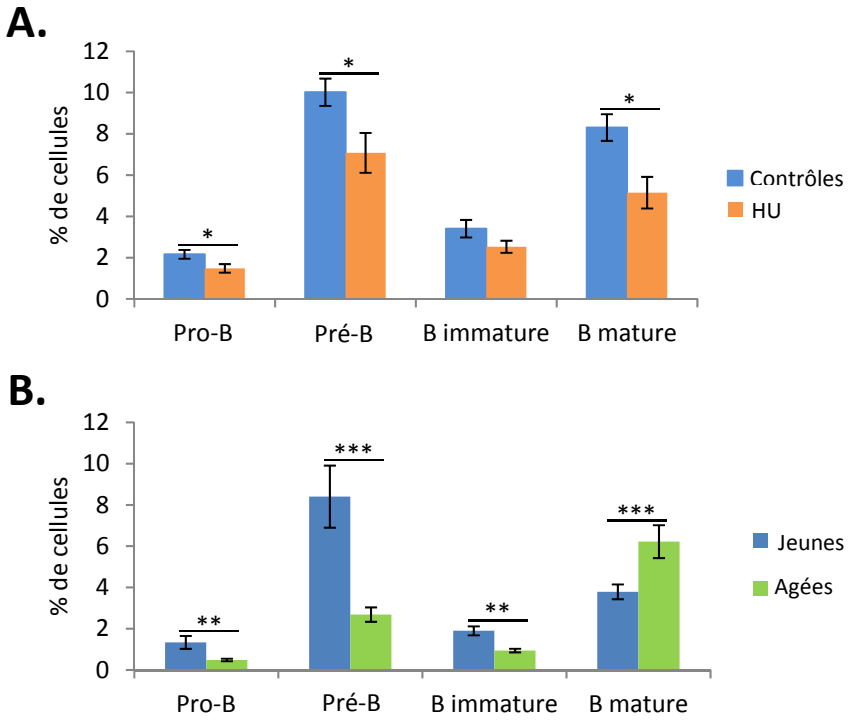


Figure 28: Impact de la suspension anti-orthostatique et du vieillissement sur la lymphopoïèse B

Chaque sous-population a été identifiée par cytométrie en flux à partir de cellules de moelle osseuse. Le pourcentage de cellules dans les stades pro-B, pré-B, B immature et B mature est défini parmi la fréquence de l'ensemble des cellules de la moelle osseuse.

A. Pourcentage de chaque sous-population pour les souris contrôles (n=8) et HU (n=8)

B. Pourcentage de chaque sous-population pour les souris jeunes (n=13) et âgées (n=13)

Les SEM sont représentés sur les graphiques. Analyse statistique: * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Pour répondre à cette question, nous avons analysé par qPCR l'expression de RAG1 (qui porte l'activité catalytique dans le complexe RAG1/2), de TdT et d'Artemis dans les cellules de moelle osseuse des différents groupes de souris (Figure 29). Une diminution significative de l'expression de RAG1 et de TdT est observée uniquement chez les souris âgées tandis que l'expression d'Artemis n'est pas impactée. L'analyse de l'expression ayant été faite à partir de l'ensemble des cellules de la moelle osseuse et non de cellules triées, cette différence peut s'expliquer, au moins en partie, par le fait que nous avons constaté chez les souris âgées une diminution des cellules pro-B et pré-B plus importante que chez les souris HU lorsqu'elles sont comparées à leur témoins respectifs. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la diminution d'expression de RAG1 et de TdT puisse être une conséquence directe du vieillissement. Malgré tout, une variation ou une absence de variation de l'expression des transcrits de ces enzymes n'exclue pas une modification de l'activité enzymatique qui impacterait la diversité du répertoire de chaînes lourdes du BCR.

3.4- Etude du répertoire BCR

Nous avons ensuite étudié le répertoire BCR afin de savoir si, d'une part, l'activité des effecteurs de la recombinaison V(D)J, et d'autre part, la diversité du répertoire, étaient modifiées par le modèle HU et le vieillissement. Pour cela, nous avons construit des banques d'ADNc codant les chaînes lourdes d'IgM. Chaque banque représente un mélange d'ARNm de cinq souris et quatre banques ont été réalisées pour chaque groupe étudié. Les différentes banques d'ADNc ont ensuite été séquencées par séquençage haut débit. Pour l'analyse, les séquences nucléotidiques de CDR3 uniques ont été isolées afin d'éliminer les biais de PCR et d'expansion clonale. Ainsi nous avons obtenu 10 406 à 27 241 séquences uniques par groupe dont 16-18% étaient non fonctionnelles et ont été exclues de l'analyse.

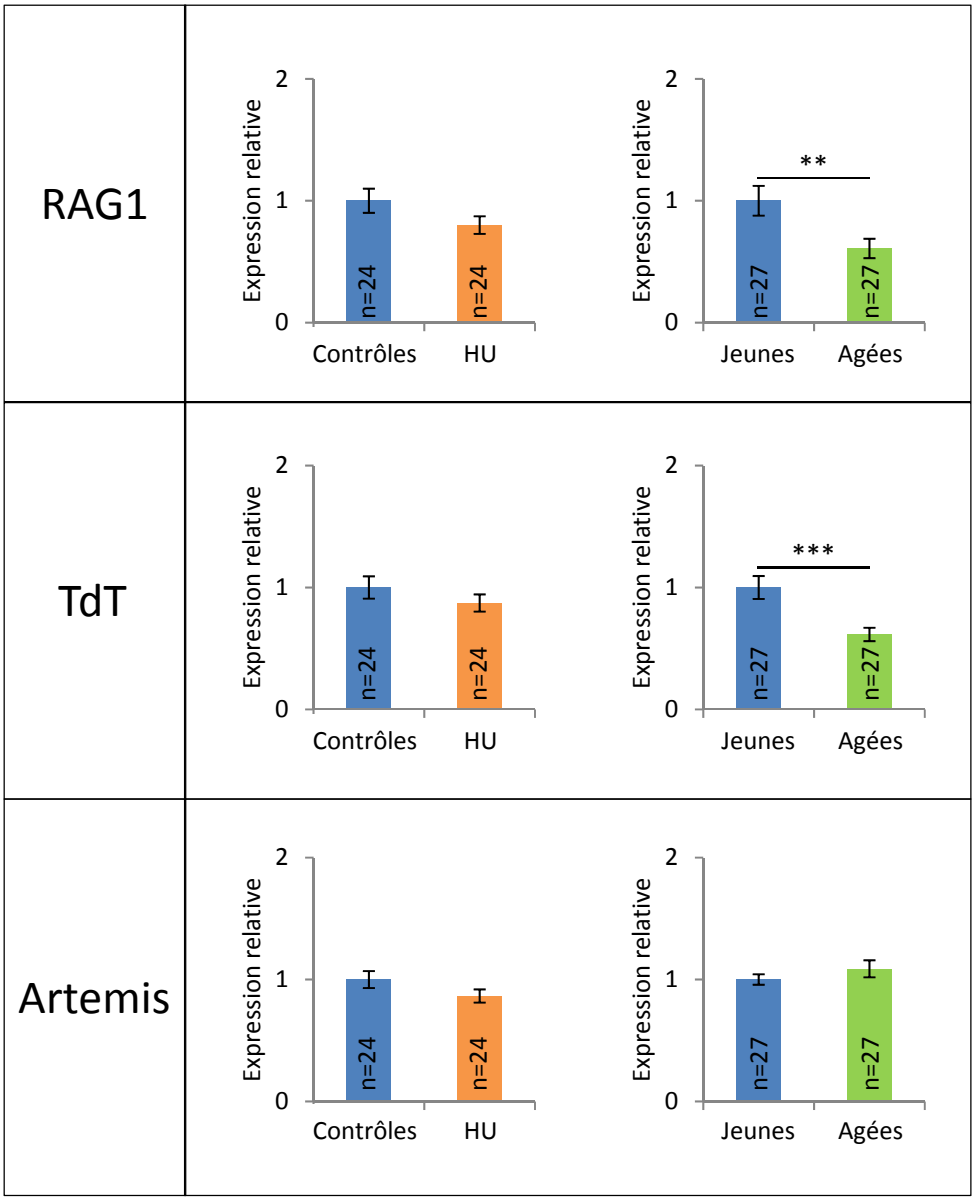


Figure 29: Impact du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur l'expression transcriptionnelle des effecteurs de la recombinaison V(D)J

Analyse de l'expression des ARNm codant RAG1, TdT et Artemis à partir des cellules totales de moelle osseuse pour chaque groupe de souris. L'expression de ces ARN chez les souris HU (graphiques de gauche) et les souris âgées (graphique de droite) a été comparée à leur témoins respectifs.

Les SEM sont représentés sur les graphiques. Analyse statistique: * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

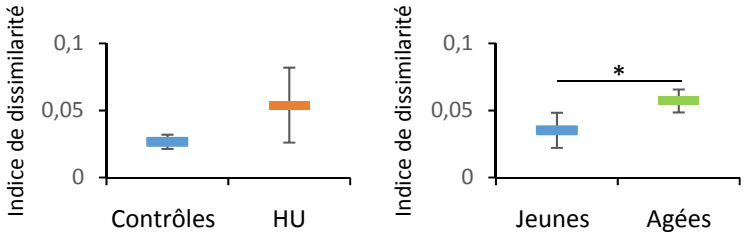
3.4.1- Etude des effecteurs de la recombinaison V(D)J

3.4.1.1- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur la précision de coupure des protéines RAGs

Ayant observé une modification de l'expression de RAG1 chez les souris âgées, nous avons voulu savoir si son activité pouvait être modifiée chez les souris HU et âgées. Pour cela, nous avons examiné les signatures laissées par les protéines RAG sur les séquences d'ARNm. En effet, lorsque les protéines RAG coupent l'ADN entre les segments codants et les RSS, certains nucléotides (nt) peuvent être supprimés à l'extrémité 3' du segment VH, des deux côtés du segment D et à l'extrémité 5' du segment JH (Lucas et al. 2015; "Antibody Diversity" 2012). Ainsi, nous avons déterminé le nombre de nucléotides (nt) manquants au niveau des extrémités 3' des segments VH (Figure 30 A et B) et 5' des segments JH (Figure 30 C) ainsi que la longueur des segments D (Figure 31). Dans un premier temps, afin de voir globalement l'impact du modèle HU et du vieillissement, nous avons défini un indice de dissimilarité (cf Matériels et Méthodes). Cette analyse a révélé que les souris âgées présentent une augmentation de la variation du nombre de nt manquants au niveau des segments VH par rapport aux souris jeunes tandis qu'aucun effet n'est observé chez les souris HU (Figure 30 A). Nous avons donc, dans un second temps, analysé le pourcentage de séquences pour chaque nombre de nt manquant (Figure 30 B). Cette analyse a permis de montrer que les profils de coupure du complexe RAG1/2 sont fortement reproductibles entre les 4 groupes de souris. En effet, nous avons constaté, pour l'ensemble des groupes étudiés, qu'environ 50% des séquences ne présentent pas de nt manquants au niveau des segments VH. La coupure d'1 à 2 nt est retrouvée dans 27 à 30% des séquences et 17 à 20% des séquences présentent une coupure de 3 à 6 nt. Seulement 2% des séquences présentent entre 7 et 16 nt manquants au niveau des segments VH. En revanche, cette analyse ne révèle pas de variation significative entre les souris jeunes et âgées, suggérant que les variations d'activité de RAG se répartissent sur toutes les longueurs de nt détectées.

Une analyse similaire a été réalisée pour les segments JH et n'a pas permis de mettre en évidence de variation significative des indices de dissimilarité entre les groupes (Figure 30 C). Enfin, nous avons analysé la longueur des segments D qui permet de traduire l'activité de coupure de RAG1/2 aux deux extrémités de ces segments. L'analyse des indices de

A. Indice de dissimilarité du nombre de nt manquants à l'extrémité 3' des segments VH



B.

	Nb de nt manquants au niveau 3' des segments VH							
	0	1	2	3	4	5	6	7 à 16
Contrôles	52,6 ± 1,1	14,4 ± 1,3	13,2 ± 1,2	8,0 ± 1,3	4,1 ± 0,4	3,3 ± 0,7	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,3
HU	51,6 ± 4,3	14,8 ± 1,5	12,6 ± 1,9	8,0 ± 2,5	5,8 ± 1,9	2,9 ± 0,9	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,3
Jeunes	48,6 ± 2	16,0 ± 1,1	13,1 ± 1	8,5 ± 1,5	6,3 ± 3,1	3,1 ± 0,3	2,3 ± 0,6	2,0 ± 0,3
Agées	49,6 ± 2,9	17,0 ± 3,1	12,8 ± 1,3	7,3 ± 1,5	5,8 ± 2,4	2,6 ± 0,7	3,1 ± 0,8	1,8 ± 0,3

C. Indice de dissimilarité du nombre de nt manquants à l'extrémité 5' des segments JH

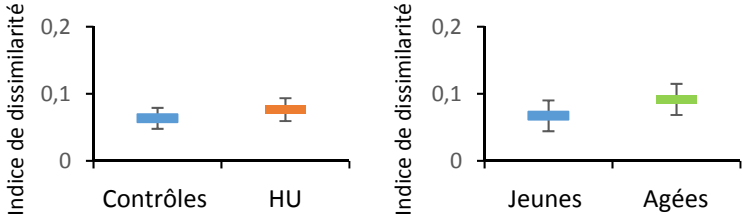


Figure 30: Variations du nombre de nucléotides manquants aux extrémités 3' des segments VH et 5' des segments JH

A. et **C.** Indices de dissimilarité du nombre de nucléotides manquants au niveau des extrémités 3' des segments VH (**A.**) et 5' des segments JH (**C.**) pour les souris HU (graphiques de gauche) et âgées (graphiques de droite) par rapport à leur témoins respectifs. Les rectangles de couleur correspondent à la moyenne des indices de dissimilarité (± écart-type) calculée au sein de chaque groupe de souris.
B. Distribution des séquences, en pourcentage ± écart-type, en fonction du nombre de nucléotides manquants aux extrémités 3' des segments VH pour l'ensemble des groupes étudiés.
Analyse statistique: * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

dissimilarité a révélé une augmentation significative de la variation de la longueur des segments D uniquement chez les souris âgées (Figure 31). Sachant que les 23 segments D se répartissent en 7 longueurs différentes allant de 9 à 28 nt à l'état non recombiné (Tableau 8) et que l'utilisation des différents segments peut être impactée par le modèle HU ou le vieillissement, nous avons analysé la répartition de chacune des 7 longueurs de D dans les quatre groupes de souris. Ainsi comme le montre les Figures 32 A et B la majorité des segments D utilisés sont ceux dont la longueur native est de 16 (42 à 49% des séquences) et 22 nt (35 à 41% des séquences). Dans le cas des HU, aucune variation par rapport aux contrôles n'est observée. En revanche, pour les souris âgées, une diminution significative des segments D de 28 nt est observée bien qu'elle soit relativement faible (Figure 32 B). Une tendance à l'augmentation des segments D de 16 nt est également observée. Ces variations, qui mettent en évidence une modification de l'utilisation des segments D, ne peuvent pas expliquer à elles seules le doublement de l'indice de dissimilarité chez les souris âgées (Figure 31). Nous avons donc ensuite analysé la distribution des séquences en fonction de la longueur réelle de leur D chez les souris HU (Figure 33 A) et âgées (Figure 33 B) comparée à leurs témoins respectifs. Tout d'abord, il est à noter que la distribution des séquences en fonction de leur longueur de D est très différente selon qu'on considère les longueurs natives (Figure 32) (qui se répartissent en 7 groupes) ou les longueurs réelles (Figure 33) (qui présentent une distribution de 4 à 23 nt). Ainsi, par exemple, dans l'ensemble des groupes de souris, 5 à 7 % des séquences possèdent un segment D de 16 nt en taille et seulement 0,1 à 0,6 % des séquences possèdent un segment D de 22 nt de long alors que ces longueurs de segments devraient être retrouvées dans 80% des séquences si la forme native était conservée. Ces résultats montrent que le processus de recombinaison V(D)J réduit fortement la longueur des segments D. En comparant les différents groupes, peu de variations sont mises en évidence pour les souris HU par rapport à leurs contrôles (Figure 33 A). Seuls les segments D de 13 nt sont affectés. En revanche, pour les souris âgées, nous avons observé un décalage du profil de la longueur des segments D. Les souris âgées présentent une diminution significative du nombre de séquences avec un segment D de 4 à 9 nt et une augmentation significative du nombre de séquences avec un segment D de 14 et 16 nt (Figure 33 B). Ceci suggère qu'avec le vieillissement, le complexe RAG1/2 supprime moins de nt aux extrémités des segments D.

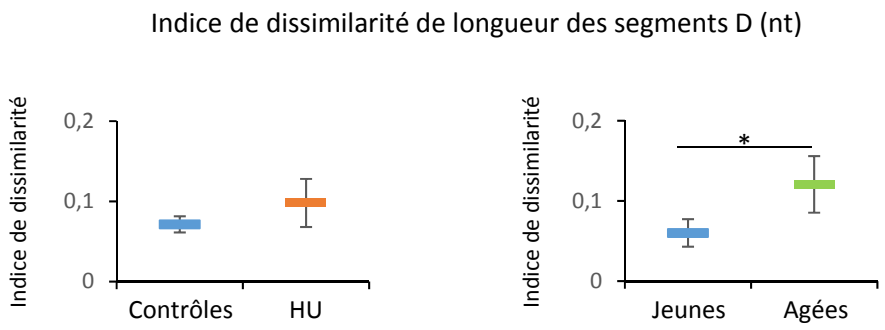


Figure 31: Indices de dissimilarité de longueur des segments D
Indices de dissimilarité de longueur des segments D pour les souris HU (graphique de gauche) et âgées (graphique de droite) par rapport à leur témoins respectifs. Les rectangles de couleur correspondent à la moyenne des indices de dissimilarité calculée au sein de chaque groupe de souris. Les écarts-types sont représentés sur les graphiques. Analyse statistique : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Longueurs (en nt) des segments D retrouvés sur le locus IgH	9	10	15	16	22	25	28
Nb de segments D (d'après http://imgt.org)	3	1	1	12	2	1	3

Tableau 8: Nombre de segments D retrouvés sur le locus IgH en fonction de leur longueur en nucléotides
Sur le locus IgH, il existe 23 segments D fonctionnels dont la longueur varie de 9 à 28 nucléotides. Dans ce tableau est noté le nombre de segments D différents ayant une même longueur.

L'ensemble de ces résultats montre que la précision de coupure du complexe RAG1/2 est affectée par le vieillissement au niveau des segments VH et D alors que le modèle HU ne semble pas avoir d'effet sur celle-ci ou des effets mineurs.

3.4.1.2- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur l'ajout de nucléotides non génomiques dans les jonctions VH-D et D-JH

Nous avons vu précédemment que l'expression de la TdT est affectée par le vieillissement. Nous avons donc voulu savoir si son activité est également affectée chez les souris HU et âgées. L'activité de la TdT consiste à ajouter de manière aléatoire des nucléotides non génomiques au niveau des jonctions VH-D et D-JH afin d'augmenter la diversité du répertoire BCR. Nous avons donc analysé le nombre de nt non génomiques ajoutés au niveau de ces jonctions dans l'ensemble des groupes de souris. L'analyse des indices de dissimilarité a révélé une augmentation significative de la variation du nombre de nt non génomiques ajoutés chez les souris âgées mais pas chez les souris HU (Figure 34 A). Afin de déterminer si la variation détectée est due à une augmentation ou une diminution du nombre de nt non génomiques ajoutés, nous avons analysé la distribution des séquences en fonction du nombre de nt non génomiques ajoutés dans les jonctions en répartissant les séquences en deux groupes selon leur longueur (0 à 6 nt et plus de 7 nt) car nous avons observé (données non montrées) que chez les souris âgées le nombre de nt non génomiques compris entre 0 et 6 nt semble diminuer alors qu'au-delà de 7 nt ce nombre semble augmenter. Les résultats obtenus ne montrent pas de différence entre les souris HU et leurs contrôles (Figure 34 B et C), ce qui est en accord avec les indices de dissimilarité. Dans les cas des souris âgées, nous observons une augmentation du nombre de nt non génomiques ajoutés. En effet, la proportion de séquences contenant 0 à 6 nt diminue (Figure 34 B) tandis que la proportion de séquences ayant plus de 7 nt augmente (Figure 34 C). Ces résultats suggèrent que lors du vieillissement, il y'a augmentation de LB dont les CDR3 contiennent un grand nombre de nt non génomiques, ce qui pourrait conduire à un accroissement de la diversité du répertoire BCR. En revanche, elle ne semble pas être impactée par le modèle HU.

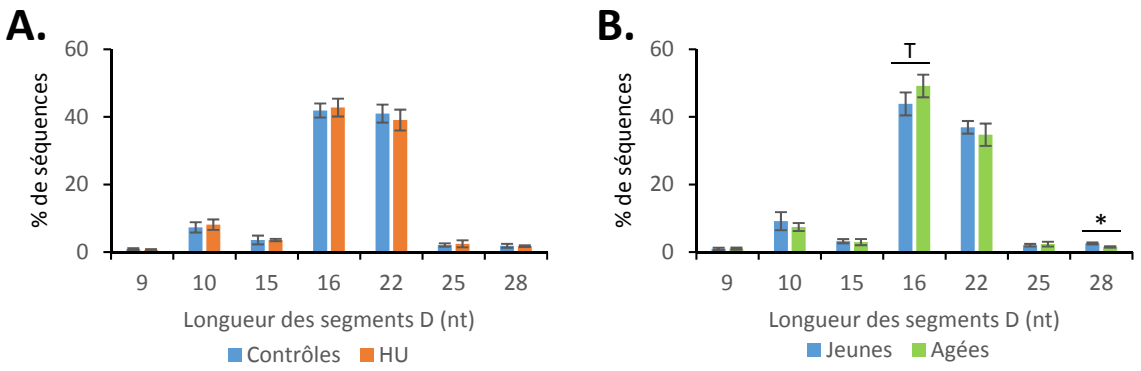


Figure 32: Distribution des séquences en fonction de la longueur native des segments D sur le locus IgH

A. et **B.** Nous avons tout d'abord identifié la fréquence des 23 segments D dans l'ensemble des groupes de souris étudiés, que nous avons ordonné en fonction de leur longueur basale sur le locus. Pour chacune des longueurs de segments D qui existent sur le locus, nous avons sommé les fréquences des séquences. Ces fréquences de segments D chez les souris HU (**A.**) et âgées (**B.**) ont été comparées à leur témoins respectifs.

Les écarts-types sont représentés sur les graphiques.

Analyse statistique : T: p=0,0685; * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

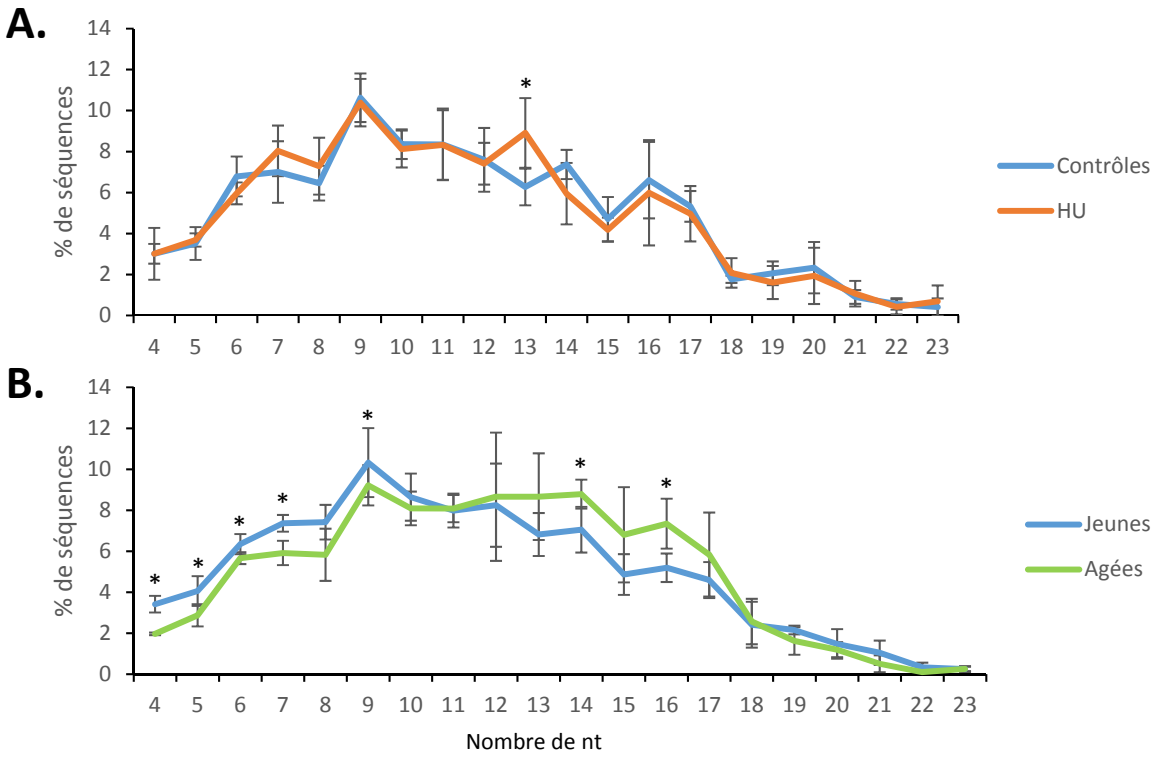


Figure 33: Distribution des séquences en fonction de la longueur réelle des segments D suite à l'activité des protéines RAGs.

A. et **B.** Distribution des séquences en fonction de la taille des segments D chez les souris HU (**A.**) et âgées (**B.**) comparées à leur témoins respectifs. Les écarts-types sont représentés sur les graphiques. Analyse statistique : * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

3.4.1.3- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le nombre de nucléotides palindromiques engendré par l'activité d'Artemis

Durant le processus de recombinaison V(D)J, Artemis va cliver les structures en épingles à cheveux créées par l'activité des protéines RAG, créant ainsi des séquences palindromiques qui vont conduire à l'ajout de nucléotides au niveau des jonctions VH-D et D-JH. Pour étudier l'activité d'Artemis, nous avons donc analysé le nombre de nt palindromiques au niveau de ces jonctions. L'analyse des indices de dissimilarité présentée dans la figure 35 A, montre une augmentation significative de la variation du nombre de nt palindromiques au niveau de la jonction VH-D chez les souris HU mais pas chez les souris âgées. Inversement, au niveau de la jonction D-JH, nous observons une augmentation de la variation du nombre de nt palindromiques chez les souris âgées uniquement. Nous avons ensuite étudié la distribution des séquences en fonction du nombre de nt palindromiques trouvés au niveau des deux jonctions (Figure 35 B). Nous avons tout d'abord constaté que 82 à 85 % des séquences ne possèdent pas de nt palindromiques au niveau de la jonction VH-D contre 70 à 75 % des séquences au niveau de la jonction D-JH. Aucune différence significative entre les groupes n'a été observée au niveau de la jonction VH-D. Au niveau de la jonction D-JH, nous avons observé une diminution significative des séquences sans nt palindromiques chez les souris âgées, suggérant que le vieillissement a pour conséquence l'augmentation du nombre de nt palindromiques au niveau de la jonction D-JH. Ceci augmenterait la diversité des CDR3 en plus des nt non génomiques ajoutés.

3.4.2- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le répertoire BCR

Jusqu'ici, nos résultats ont montré que le modèle HU ne semble pas avoir d'effets majeurs sur les effecteurs de la recombinaison V(D)J contrairement au vieillissement qui semble les impacter. Or, si ces effecteurs sont altérés, il est très probable que le choix des segments VH, D et JH soit également impacté. Notons que l'absence d'effet sur les effecteurs dans le modèle HU ne permet pas d'exclure un impact sur le choix des segments. Pour vérifier cette hypothèse nous avons étudié la fréquence à laquelle les différents segments VH, D et JH ont été recombinés.

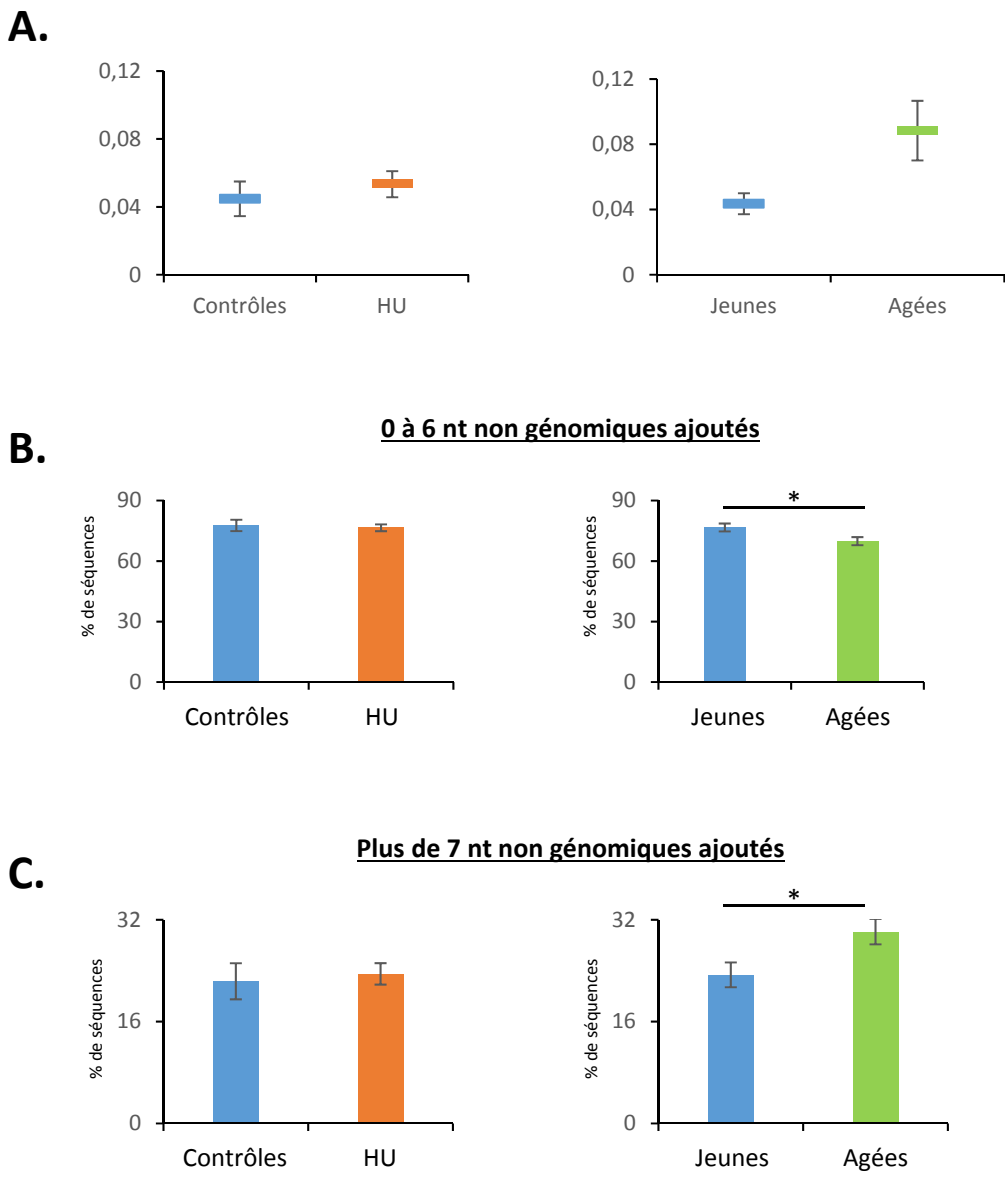


Figure 34: Nucléotides non génomiques au niveau des jonctions VH-D et D-JH.
A. Indices de dissimilarité du nombre de nucléotides non génomiques ajoutés au niveau des jonctions VH-D et D-JH (ou régions N) pour les souris HU (graphique de gauche) et âgées (graphique de droite) par rapport à leur témoins respectifs. Les rectangles de couleur correspondent à la moyenne des indices de dissimilarité calculée au sein de chaque groupe de souris.
B. et **C.** Pourcentages de séquences ayant de 0 à 6 (**B.**) ou plus de 7 (**C.**) nucléotides non génomiques ajoutés au niveau des jonctions VH-D et D-JH chez les souris HU (graphiques de gauche) et âgées (graphiques de droite).
Les écarts-types sont représentés sur les graphiques. Analyse statistique : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

3.4.2.1- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le choix des segments VH

Dans le locus IgH murin, il y'a 152 segments VH regroupés en 16 familles. Nous avons analysé, pour chacun des groupes, la répartition des différentes familles (Figure 36). D'une manière générale, nous constatons que le taux d'utilisation des différentes familles de segments VH est constant entre les différents groupes même si quelques différences ont été observées entre les souris âgées et jeunes.

L'analyse des souris HU n'a pas permis de mettre en évidence de variation dans l'utilisation des différentes familles (Figure 36 A). En revanche, dans le cas des souris âgées, nous avons observé une augmentation significative des familles VH1 et VH5, ainsi qu'une diminution des familles VH4, VH7 et VH10 (Figure 36 B). Globalement, sur 15 familles réarrangées, 5 sont impactées significativement par le vieillissement et 3 présentent une tendance à la variation.

Un paramètre important dans le choix des segments lors de la recombinaison V(D)J est la localisation du segment sur le locus subdivisé en 3 zones (de 5' vers 3' : VH distaux, médians et proximaux (Figure 37 A)). Nous avons donc analysé les variations des segments en fonction de leur position sur le locus. Sur les 131 segments VH étudiés, 62 % sont des VH distaux, 26 % sont des VH médians et seulement 12 % sont des VH proximaux. Cependant, les VH distaux représentent en réalité 45 à 48 % environ des segments détectés, les VH médians 43 à 50 % et les VH proximaux 6 à 9 % (Figure 37 C). Ces données mettent en évidence un biais d'utilisation des segments VH lors de la recombinaison V(D)J. L'étude des variations d'utilisation des différents groupes de segments VH, réalisée par l'analyse des indices de dissimilarité, a permis de mettre en évidence une variation plus importante de l'utilisation des segments VH distaux pour les souris HU et âgées (Figure 37 B). De plus, dans le cas des souris âgées uniquement, une augmentation de la variation est observée pour les VH médians, les VH proximaux ne présentant qu'une tendance à l'augmentation (Figure 37 B).

Afin d'affiner cette analyse, nous avons ensuite regardé le nombre de segments VH utilisés dans chaque zone du locus IgH ainsi que le nombre de VH variant significativement entre les groupes de souris. Ainsi, sur 81 segments VH distaux détectés, seulement 4 (soit 1.3% des segments totaux) pour les HU et 8 (soit 8,8% des segments totaux) pour les souris âgées présentent une variation significative de leur utilisation. Dans le cas des VH médians, sur les 34 VH détectés, seuls 2 varient pour les souris HU contre 9 pour les souris âgées (Figure 37 D).

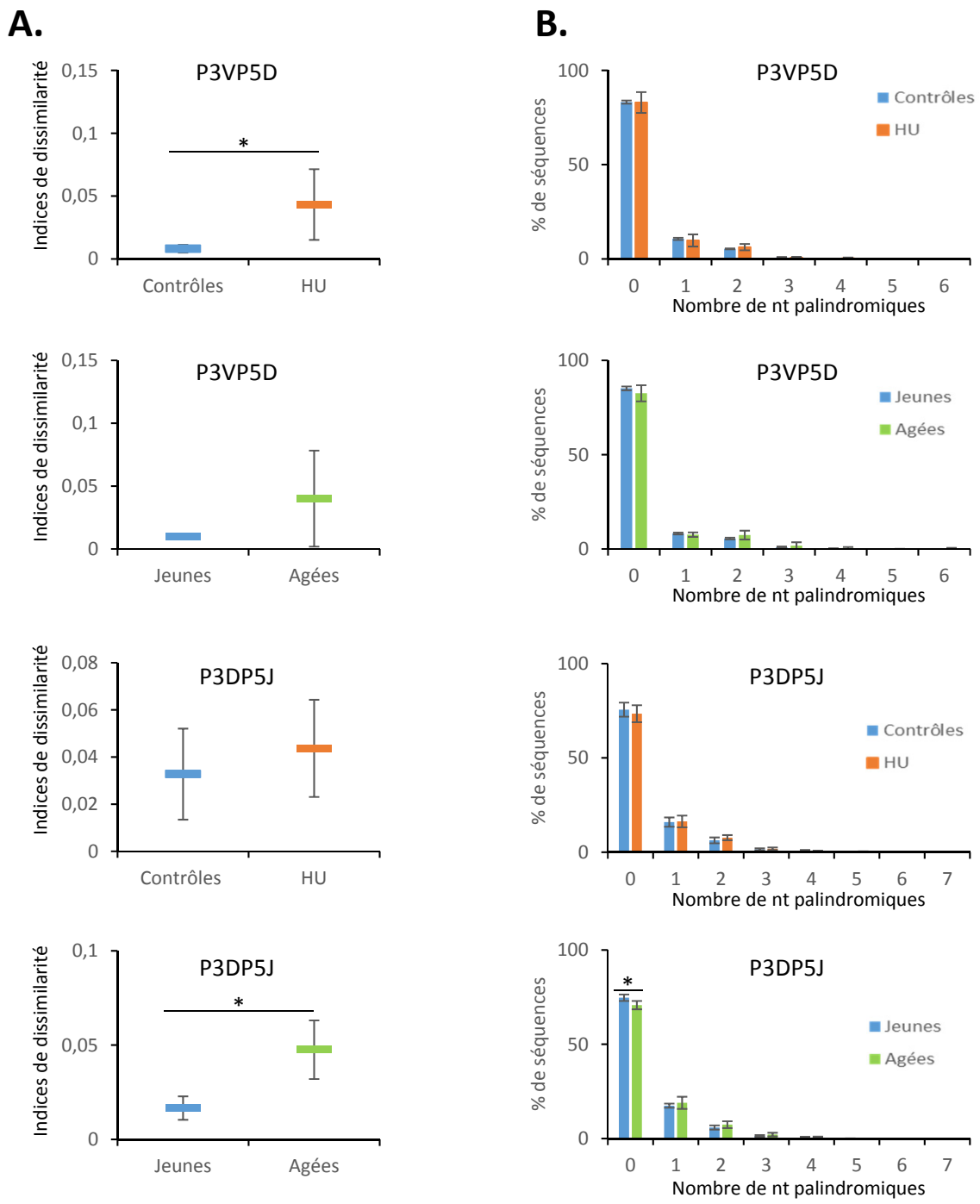


Figure 35: Nucléotides palindromiques créés par l'activité Artemis lors de la recombinaison V(D)J

A. Indices de dissimilarité du nombre de nucléotides palindromiques au niveau des extrémités 3'VH/5'D et 3'D/5'JH chez les souris HU et âgées par rapport à leurs témoins respectifs. Les rectangles de couleur correspondent à la moyenne des indices de dissimilarité calculée au sein de chaque groupe de souris.

B. Distribution des séquences en fonction du nombre de nucléotides palindromiques au niveau des extrémités 3'VH/5'D et 3'D/5'JH chez les souris HU et âgées par rapport à leurs témoins respectifs.

Les écarts-types sont représentés sur les graphiques. Analyse statistique : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Sachant que la majorité des segments utilisés sont des VH distaux (44 à 48 % des segments détectés) et des VH médians (42 à 50 % des segments) (Figure 37 C), nous avons ensuite analysé les fréquences d'utilisation des segments VH majoritaires dans ces deux régions. Les résultats présentés dans la figure 38 montrent que les souris HU ne présentent pas de variation dans l'utilisation de ces segments tandis que sur les 12 segments analysés (représentant plus de 50% des VH recombinés), les souris âgées présentent une modification significative de 6 segments VH. De façon intéressante, sur les 7 segments de la région médiane analysés, 4 présentent une variation d'utilisation.

L'ensemble de ces résultats montre que le vieillissement impacte de manière significative le choix des segments VH les plus recombinés contrairement au modèle HU qui ne semble pas avoir d'effet suffisamment important pour être détecté précisément.

3.4.2.2- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le choix des segments D

De la même manière que pour les segments VH, nous avons étudié l'effet du modèle HU et du vieillissement sur le choix des segments D. L'analyse des indices de dissimilarité des fréquences d'utilisation des segments D a révélé une augmentation de la variation de ces fréquences aussi bien chez les souris HU que chez les souris âgées comparées aux témoins (Figure 39 A). Nous avons ensuite analysé les fréquences d'utilisation des 6 familles de segments D du locus IgH. Parmi ces familles, deux sont très largement représentées : la famille D1 (retrouvée dans 35-40 % des séquences) et la famille D2 (retrouvée dans 18-22 % des séquences) (Figure 39 B). Cette analyse n'a pas permis de mettre en évidence de variation d'utilisation des familles DH (Figure 39 B), ni de segments DH (Figure 39 C) chez les souris HU comparativement aux souris contrôles. En revanche, dans le cas des souris âgées, nous avons constaté une augmentation significative de la famille D2 ainsi qu'une diminution significative des familles D3 et D6 (Figure 39 B). L'analyse des fréquences de chaque segments D a permis d'identifier 4 segments D comme étant significativement impactés par le vieillissement (Figure 39 C). Il est à noter que ces 4 segments sont très peu représentés puisqu'ils sont recombinés à une fréquence comprise entre 0,1 et 2,3 % (résultats non montrés). En conclusion, le choix des segments D, lors de la recombinaison V(D)J, semble peu impacté par le vieillissement et très peu impacté par le modèle HU.

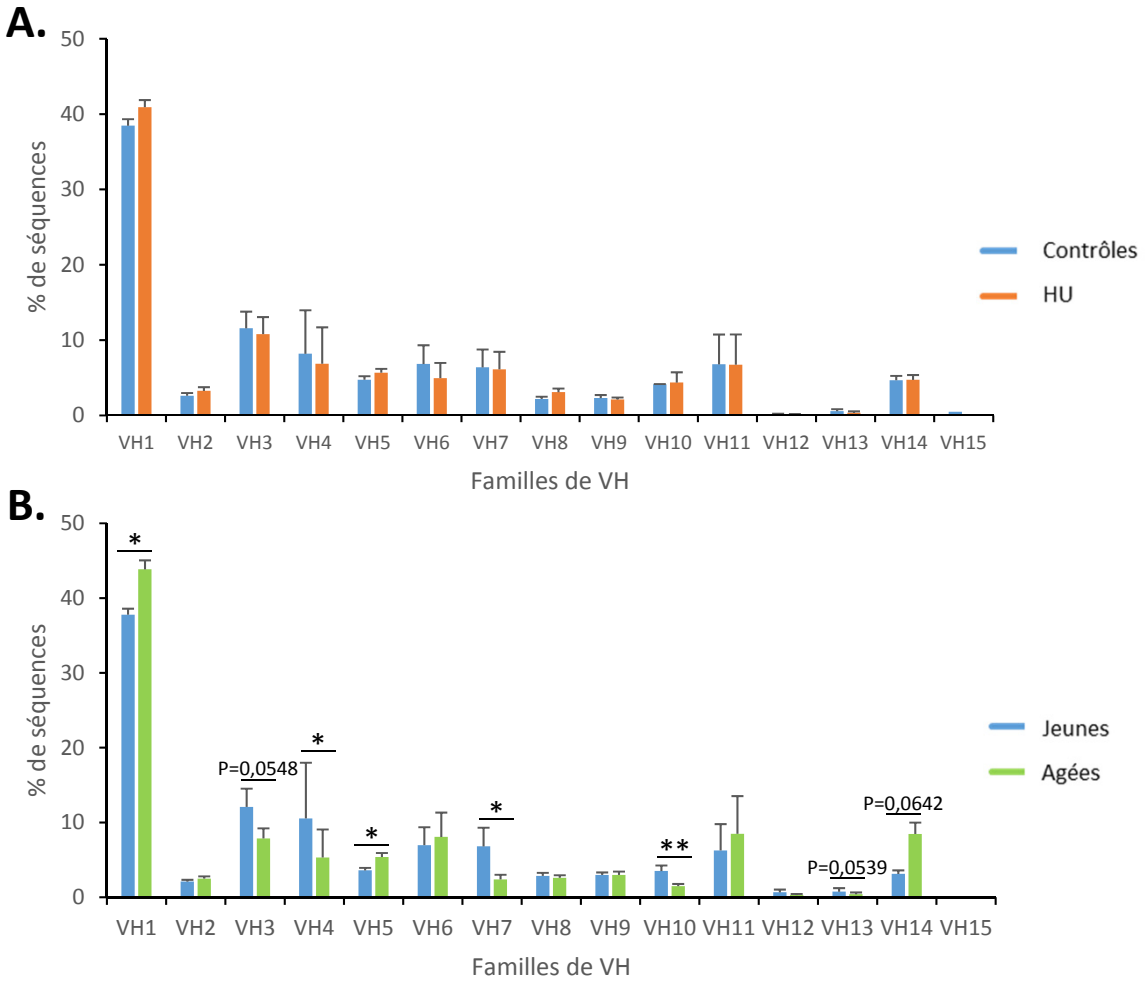


Figure 36: Fréquences d'utilisation des familles VH

A. et **B.** Fréquences d'utilisation des différentes familles VH dans les cellules de moelle osseuse provenant des souris HU (**A.**) et âgées (**B.**), comparées à leur témoins respectifs.
Les écarts-types sont représentés sur les graphiques. Analyse statistique : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

3.4.2.3- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le choix des segments JH

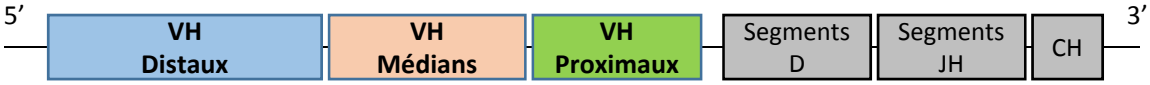
De la même manière que pour les segments VH et D, nous avons étudié l'effet du modèle HU et du vieillissement sur le choix des segments JH. Aucune différence entre les indices de dissimilarité n'a été observée pour l'ensemble des groupes étudiés (Figure 40 A). Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de la fréquence d'utilisation des 4 segments JH existant au sein du locus IgH murin (Figure 40 B). Ces résultats montrent que le modèle HU et le vieillissement n'impactent pas le choix des segments JH lors de la recombinaison V(D)J.

3.4.2.4- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur la longueur des CDR3

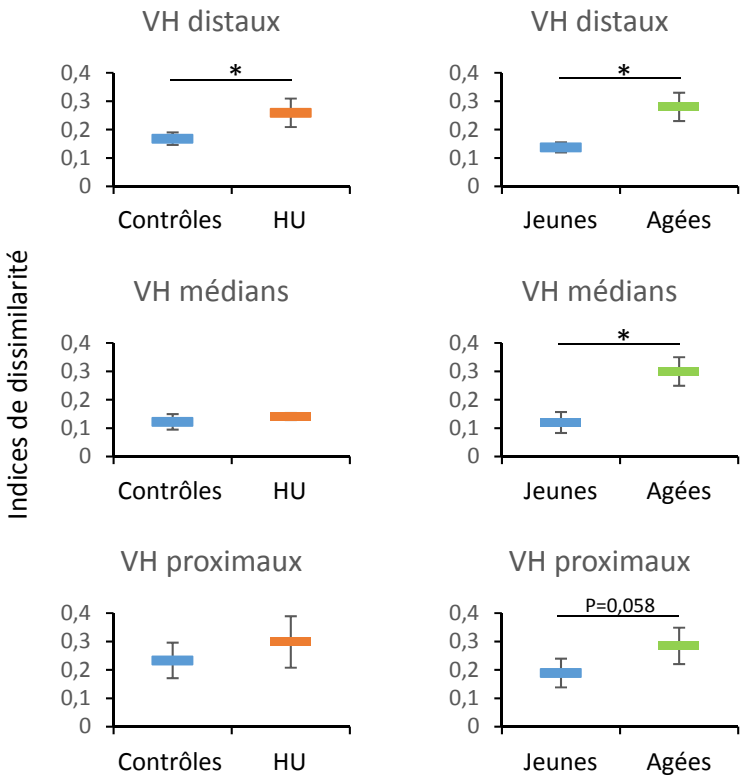
Jusqu'ici, nous avons montré que le vieillissement impacte l'activité des effecteurs de la recombinaison V(D)J ainsi que le répertoire de segments VH utilisés. L'ensemble de ces données laisse supposer que la diversité de jonction pourrait être impactée et par conséquent la région CDR3 (zone de reconnaissance de l'antigène). Au contraire, le modèle HU semble très peu altérer ces différents éléments. Afin de déterminer si la diversité de jonction est effectivement impactée par le vieillissement (et dans une moindre mesure par la suspension anti-orthostatique), nous avons analysé la longueur en acide aminés (aa) du CDR3 pour chacun des groupes de souris.

Une première analyse globale, par le calcul d'indice de dissimilarité, a révélé que les souris âgées, contrairement aux souris HU, présentent une augmentation significative de la variation de la taille du CDR3 (Figure 41 A). L'analyse de la distribution des séquences selon leur longueur de CDR3 en aa a permis de montrer d'une part, que les séquences ont une taille moyenne de CDR3 de 12 aa pour les quatre groupes de souris, et d'autre part, que la majorité des CDR3 se répartissent entre 10 et 15 aa. De façon intéressante, nous avons constaté que la distribution des séquences en fonction de la taille du CDR3 (en aa) chez les deux groupes de souris témoins était extrêmement semblable, mettant en évidence l'existence d'une stabilité dans les jonctions (Figure 41 B et C). En accord avec l'indice de dissimilarité, cette analyse détaillée de la distribution n'a pas permis de mettre en évidence de variation significative dans

A.



B.



C.

	Contrôles	HU	Jeunes	Agées
VH distaux	45,2	48,4	44,2	47,9
VH médians	47,4	42,7	50,1	44,2*
VH proxi.	7,3	8,9	5,7	7,8*

D.

	Nb de segments VH total analysés	Nb de segments VH significativement différents	
		HU	Agées
VH distaux	81	4 (1,3 %)	8 (8,8 %)
VH médians	34	2 (0,6 %)	9[1] (21,2 %)
VH proxi.	16	0	2 (0,7 %)

Figure 37: Fréquences d'utilisation des différents segments VH en fonction de leur localisation dans le locus IgH

A. Schéma présentant la localisation des VH distaux, médians et proximaux dans le locus IgH.

B. Indices de dissimilarité des VH distaux, médians et proximaux pour les souris HU (graphiques de gauche) et âgées (graphiques de droite) par rapport à leur témoins respectifs. Les rectangles de couleur correspondent à la moyenne des indices de dissimilarité calculée au sein de chaque groupe de souris (± écart-type).

C. Analyse de la fréquence d'utilisation des VH en fonction de leur position sur le locus. Les résultats sont présentés en % de séquences.

D. Nombre de segments VH totaux selon leur localisation dans le locus et nombre de VH significativement différents chez les souris HU et âgées comparés à leur témoins respectifs. Entre parenthèses sont indiquées les différences, en pourcentage, de fréquences d'utilisation de l'ensemble des segments VH, entre les groupes de souris HU et âgées et leur témoins respectifs.

([1] : sur 9 segments médians 7 sont significativement différents avec un p<0,05 et 2 sont différents avec une tendance dont le p < 0,065.)

Analyse statistique : * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

le cas des souris HU, exceptée pour les CDR3 de 21 aa qui sont cependant minoritaires. Dans le cas des souris âgées, nous avons constaté une diminution significative du nombre de séquences ayant un CDR3 de 7, 8, 9, 11 et 18 aa et une augmentation significative de la fréquence des séquences ayant un CDR3 de 14 et 20 aa. Ces données suggèrent une augmentation de la taille des CDR3 au cours du vieillissement. Malgré l'absence de variation significative chez les souris HU, il est à noter une augmentation des séquences ayant un CDR3 de 14 et 15 aa. Bien que ces variations soient non significatives, elles vont dans le même sens que chez les souris âgées. Cette absence de significativité pourrait être expliquée par un effet moindre du modèle HU sur la lymphopoïèse B par rapport au vieillissement naturel. En conclusion, le vieillissement impacte la longueur du CDR3, contrairement au modèle HU, suggérant une modification de la diversité de jonction ce qui pourrait impacter les capacités de reconnaissance des antigènes par les lymphocytes B.

3.5- Effets du vieillissement et de la suspension anti-orthostatique sur le remodelage chromatinien au cours de la lymphopoïèse B

Les analyses précédentes ont permis de montrer que le vieillissement, et dans une moindre mesure la suspension anti-orthostatique, impactent le choix des segments VH distaux et médians (uniquement pour les souris âgées) (Figure 37 B). Un des régulateurs connus pour être impliqué dans la sélection des segments VH est la structure chromatinienne et notamment les modifications post-traductionnelles des histones. Parmi ces modifications, H3K9me2 et H3K27me3 ont été décrites pour impacter le choix des segments dans les régions distale et proximale. Afin d'identifier les mécanismes potentiellement associés aux modifications de la recombinaison V(D)J nous nous sommes donc concentrés sur ces deux types de méthylation ainsi que leurs facteurs associés.

3.5.1- Pax5 et H3K9me2

La méthylation H3K9me2 est connue pour réprimer l'expression des gènes et est fortement retrouvée au niveau des VH distaux. Cette répression peut être supprimée par le facteur Pax5 qui est essentiel à la différenciation des cellules B précoces (Johnson et al. 2004). Lescale et al ont précédemment suggéré une diminution de l'expression de ce facteur chez des souris HU et âgées (Lescale et al. 2015). Nous avons donc tout d'abord confirmé l'existence de cette

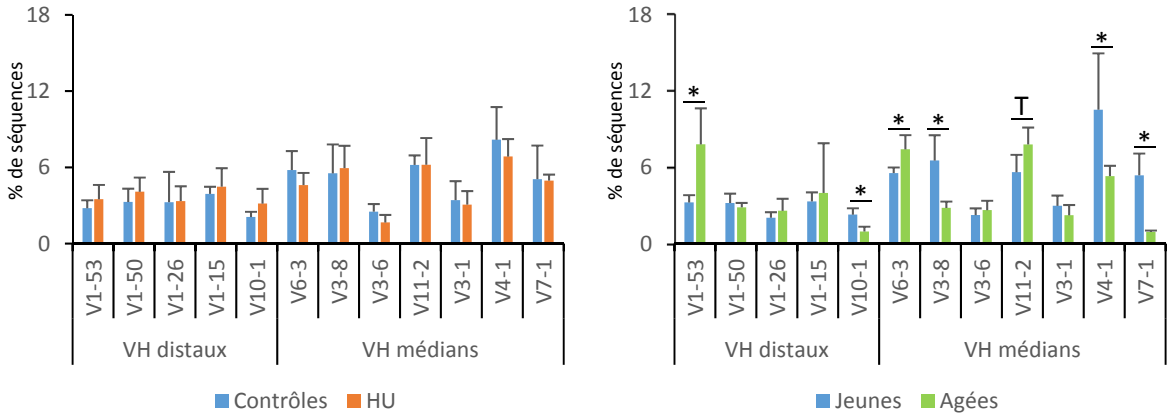


Figure 38: Fréquence d'utilisation des segments VH majoritairement retrouvés dans le répertoire BCR des souris contrôles.

Fréquences des 12 segments VH les plus utilisés dans les deux groupes de souris contrôles, selon leur localisation dans le locus, comparées aux groupes de souris HU et âgées.

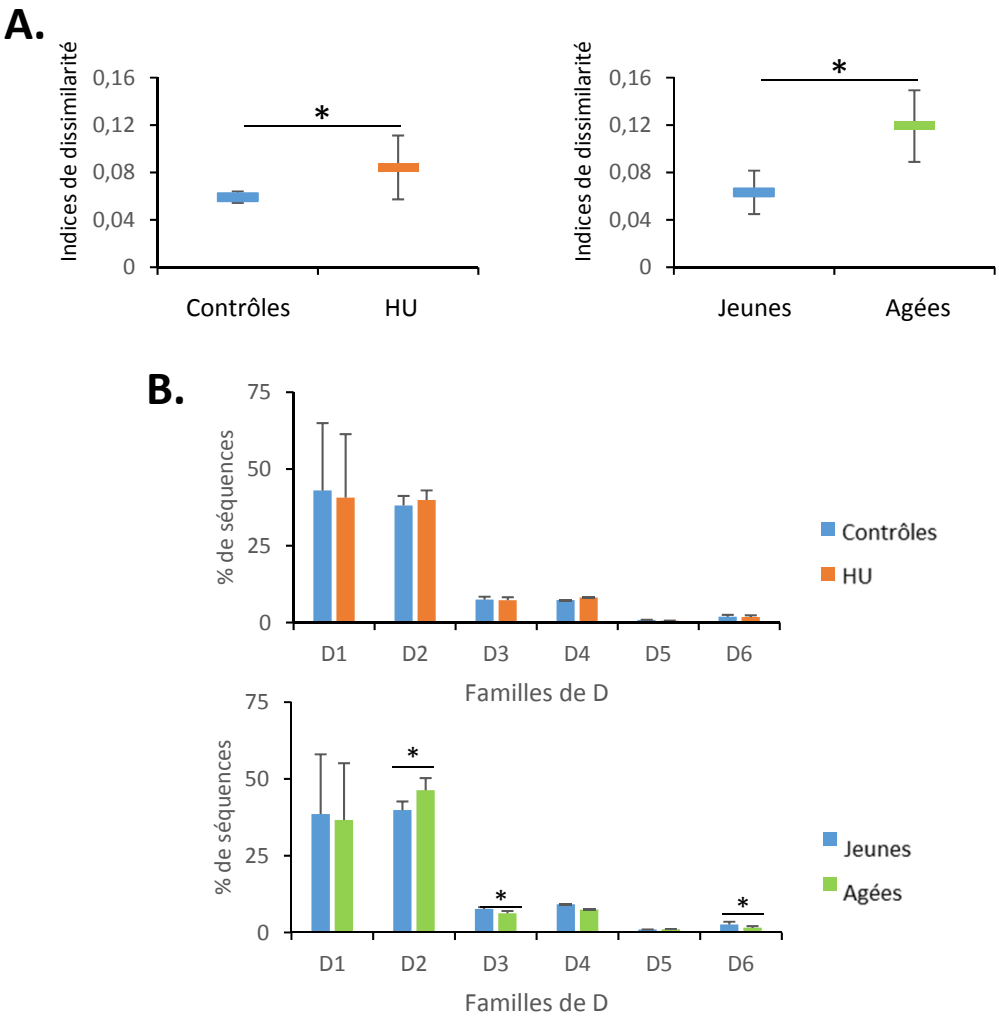
Analyse statistique : T: p<0,065; * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

diminution dans les cellules de moelle osseuse des souris HU et âgées. Comme le montre la figure 42 A, nous avons observé une diminution significative de 30% chez les souris HU et de 40% chez les souris âgées des ARNm codant pour Pax5. Nous avons ensuite voulu savoir si cette diminution est corrélée à une modification de la méthylation H3K9me2 au cours de la lymphopoïèse B. Pour cela, nous avons réalisé une analyse globale du taux de H3K9me2 dans les quatre derniers stades de différenciation des lymphocytes B par cytométrie en flux. Pour chaque stade nous avons pu discriminer deux types de population, une présentant un fort taux de H3K9me2 (H3K9me2 High) et une présentant un faible taux (H3K9me2 Low). D'une manière générale, les quatre stades présentent un faible taux de H3K9me2 puisque 80 à 90 % des cellules font parties de la sous-population H3K9me2 Low (Figures 42 B et C). De plus, aucune variation n'a pu être observée chez les souris HU et âgées. Ainsi, si cette modification est impactée dans nos deux modèles, l'effet est plutôt localisé sur des régions précises du génome et non généralisé.

3.5.2- EZH2 et H3K27me3

La tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) a été détectée au niveau des VH proximaux, conduisant à une diminution de leur utilisation, favorisant ainsi l'expression des VH distaux (Xu et al., 2008). Cette méthylation est due à l'activité du complexe PRC2 (« Polycomb Repressive complexe », composé de 4 sous-unités : EZH2, Suz12, EED, RAP46/48), dont l'activité de méthyl-transférase est portée par EZH2 (Margueron and Reinberg 2011). De façon intéressante, des souris KO pour EZH2 présentent un blocage de la lymphopoïèse B entre les stades pro-B/pré-B, montrant ainsi l'importance de cette protéine dans le développement des cellules B (Mochizuki-Kashio et al. 2011). Nous avons donc étudié le taux d'EZH2 et le taux de H3K27me3 dans les quatre derniers stades de la lymphopoïèse B comme précédemment.

Dans le cas d'EZH2, nous avons pu identifier deux niveaux d'expression nommés High (fort taux) et Low (faible taux). Comme montré dans les figures 43 A et B, les cellules pré-B, B immatures et B matures présentent majoritairement un faible taux d'EZH2 (en moyenne 80% des cellules sont Low), tandis que 40 % des cellules pro-B ont un faible taux et 60 % un fort taux. En comparant les souris HU à leurs contrôles, nous n'avons pas observé de modification du taux d'EZH2 dans les quatre stades analysés (Figure 43 A). En revanche, les souris âgées



C.

	Nb de segments D significativement différents par rapport aux souris contrôles						Nb de segments D total analysés
Familles	D1	D2	D3	D4	D5	D6	
HU	0	0	0	0	0	0	23
Agées	0	1	1	0	0	2	

Figure 39: Variation de la fréquence d'utilisation des segments D chez les souris HU et âgées

A. Indices de dissimilarité des fréquences d'utilisation des segments D chez les souris HU (graphique de gauche) et âgées (graphique de droite) par rapport à leur témoins respectifs. Les rectangles de couleur correspondent à la moyenne des indices de dissimilarité calculée au sein de chaque groupe de souris (± écart-type).

B. Fréquences d'utilisation des familles D chez les souris HU (graphique du haut) et âgées (graphique du bas), comparées à leur témoins respectifs. Les écarts-types sont représentés sur les graphiques.

C. Nombre de segments D significativement différents au sein de chaque famille D chez les souris HU et âgées comparés à leur témoins respectifs.

Analyse statistique : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

présentent une diminution au stade pro-B du nombre de cellules exprimant fortement EZH2 et par conséquent une augmentation de celles exprimant faiblement EZH2 (Figure 43 B). Ces résultats mettent en évidence une diminution du taux d'EZH2 au stade pro-B, qui n'est pas observée dans les stades pré-B et B immature. Dans le cas des B matures, une diminution faible du nombre de cellules EZH2 High a également été observée. Cependant, les cellules étant majoritairement EZH2 Low, il est plus difficile de conclure sur une diminution du taux d'EZH2 dans cette sous-population. Ainsi, dans le cas des souris âgées, seul le stade pro-B présente une diminution du taux d'EZH2. Sachant que c'est à ce stade que se met en place la recombinaison V(D)J de la chaîne lourde d'Ig, nous avons analysé le taux de H3K27me3. Trois sous-populations ont été définies selon leur taux de H3K27me3 : faible (H3K27me3 low), intermédiaire (H3K27me3 int) et fort (H3K27me3 high). Globalement, le taux de H3K27me3 est stable des stades pro-B à B immature (la majorité des cellules ont un taux intermédiaire), puis augmente au stade B mature (Figures 43 C et D). De plus, en comparant les différents groupes de souris, nous n'avons pas identifié de variation globale du taux de cette modification dans les différents stades, notamment dans les cellules pro-B des souris âgées. Ce dernier point suggère que soit l'activité d'EZH2 n'est pas la seule activité responsable de la tri-méthylation d'H3K27 (EZH1, homologue d'EZH2 pourrait être impliqué), soit les activités dé-méthylases sont réduites, soit l'impact sur cette méthylation est très localisée dans le génome et ne peut être détectée par une analyse globale.

En conclusion, ces premières analyses n'ont pas permis de mettre en évidence des variations au niveau des taux de deux modifications post-traductionnelles des histones connues pour être impliquées dans la régulation de la recombinaison V(D)J. Cependant leur rôle dans les dérégulations observées de la recombinaison V(D)J ne peut être exclu. Une analyse plus précise du locus IgH par mini-ChIP seq dans les cellules pro-B sera nécessaire.

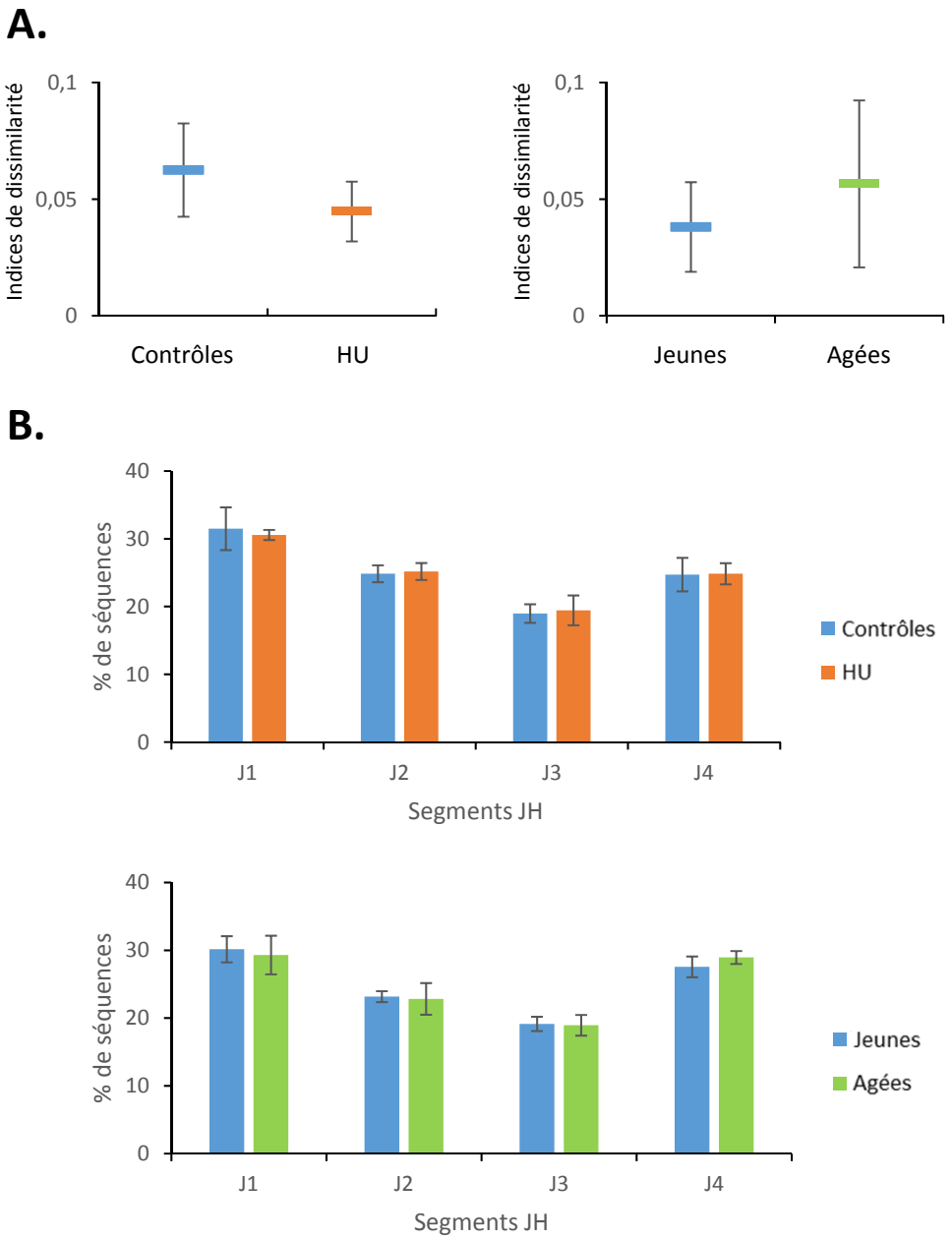


Figure 40: Fréquences d'utilisation des segments JH chez les souris HU et âgées

A. Indices de dissimilarité des fréquences d'utilisation des segments JH chez les souris HU (graphique de gauche) et âgées (graphique de droite) par rapport à leur témoins respectifs. Les rectangles de couleur correspondent à la moyenne des indices de dissimilarité calculée au sein de chaque groupe de souris (± écart-type).

B. Fréquences d'utilisation des différents segments JH chez les souris HU (graphique du haut) et âgées (graphique du bas), comparées à leur témoins respectifs. Les écarts-types sont représentés sur les graphiques.

4- DISCUSSION

4.1- Impacts du modèle HU et du vieillissement sur le taux de corticostérone sérique

Nos travaux s'inscrivent dans la continuité de ceux réalisés par Lescale et al., qui montrent que le modèle HU et le vieillissement semblent avoir des effets similaires sur le développement des cellules B au sein de la moelle osseuse (Lescale et al. 2015). Notre objectif était d'approfondir cette analyse en étudiant le répertoire BCR dans ces deux groupes de souris. Le modèle HU pouvant engendrer un stress chez la souris, nous avons tout d'abord évalué l'état de stress des souris par le dosage de la corticostérone sérique. Les concentrations mesurées n'ont pas présenté de différence entre les souris HU et contrôles. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux menés sur des souris soumises à la suspension anti-orthostatique pendant 21 jours (Gaignier et al. 2014; Lescale et al. 2015). Ainsi, les animaux HU semblent capables de s'adapter à la suspension anti-orthostatique.

En revanche, les souris âgées ont présenté une diminution de 44 % de la concentration en corticostérone par rapport aux souris de 14 semaines. Nos données sont en contradiction avec plusieurs publications, elles-mêmes présentant des résultats contradictoires. En effet, certaines études ont montré que le taux de corticostérone augmente avec l'âge en lien avec la diminution de l'efficacité du rétrocontrôle négatif de l'axe HHS (Tronche et al. 2010; Garrido et al. 2012) tandis que d'autres ont montré qu'il n'y a pas de différence de concentration de corticostérone sérique entre des animaux jeunes et âgés (Rapaport et al. 1964; Meaney et al. 1992). Dans notre cas, la diminution de la corticostérone sérique observée chez les souris âgées pourrait être expliquée par le temps d'hébergement (et donc d'habituation au manipulateur) des animaux. En effet, les souris âgées ont été hébergées pendant 5 mois, contre 8 semaines pour les souris jeunes. En accord avec ce point, il a été mis en évidence que la manipulation quotidienne des animaux peut diminuer leur état de stress et la concentration en corticostérone (Meaney et al. 1992; Viau et al. 1993).

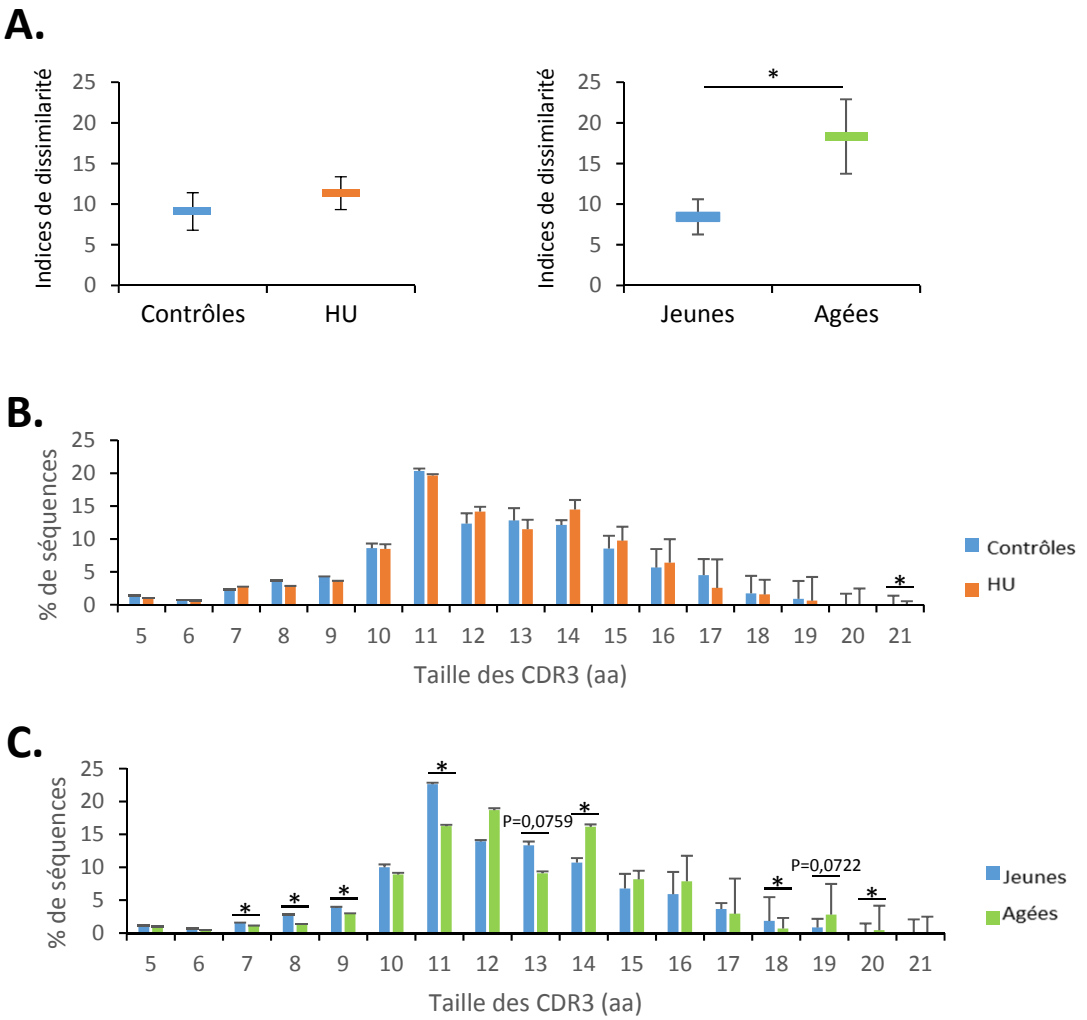


Figure 41: Analyse de la taille du CDR3.
A. Indices de dissimilarité de la taille des CDR3 chez les souris HU (graphique de gauche) et âgées (graphique de droite) par rapport à leur témoins respectifs. Les rectangles de couleur correspondent à la moyenne des indices de dissimilarité calculée au sein de chaque groupe de souris (± écart-type).
B. et **C.** Distribution des séquences (± écart-type) en fonction de la taille du CDR3 (en acides aminés) chez les souris HU (D.) et âgées (E.) comparée à leur témoins respectifs.
Analyse statistique : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

4.2- Impacts du vieillissement et du modèle HU sur la lymphopoïèse B

Comme l'ont montré les travaux de Lescale et al., le modèle HU impact la lymphopoïèse B d'une manière similaire aux souris âgées. Cette altération ne peut pas, ici, être associée au stress. Les données obtenues par Lescale et al. suggèrent qu'une des causes serait la modification de la structure osseuse (Lescale et al. 2015). En effet, l'hématopoïèse est dépendante des niches osseuses. Des travaux ont montré que la perte osseuse observée chez les individus âgés est liée à la diminution des ostéoblastes (cellules essentielles au métabolisme osseux). Or, ces cellules sont indispensables à la survie des progéniteurs lymphoïdes, et donc à la lymphopoïèse B, de par notamment leur capacité à sécréter de l'IL-7 et de la chimiokine CXCL12 (Lee and Choi 2015; W. Lu et al. 2018), contribuant à l'établissement d'un microenvironnement favorable. Il a été montré que le modèle HU induit également une perte d'ostéoblastes (Basso, Bellows, and Heersche 2005). Ces données sont en accord avec les nôtres, puisque les souris HU et âgées présentant notamment une diminution des cellules pro-B et pré-B.

De plus, en accord avec ces données, la modification du microenvironnement participe notamment à la régulation de l'expression de la protéine RAG2 et de son activité (Labrie et al. 2004). De façon intéressante, en accord avec cette étude, nous avons observé une diminution de l'expression de RAG1 et une modification de l'activité du complexe RAG1/2, mais uniquement pour les souris âgées.

Enfin, une autre explication pourrait être liée à l'épigénome. En effet, la diminution des CSH, et donc des cellules qui en dérivent, peut être due à une modification du profil de méthylation de l'ADN des CSH, associée à une diminution du taux d'EZH2 (Beerman et al. 2010). Dans notre cas, cette diminution a été retrouvée uniquement chez les cellules pro-B des souris âgées et pourrait être un des facteurs expliquant la modification de la lymphopoïèse B chez ces souris. L'absence de similitude avec les souris HU, peut être expliquée par le fait que le méthylome des CSH est dépendant du nombre de divisions que celles-ci ont eu à effectuer, or les CSH des souris âgées ont forcément effectué plus de divisions que celles des souris HU.

Globalement, ces différents facteurs (modification de RAG1/2 et EZH2) ne semblent pas intervenir chez les souris HU, ce qui suggère que l'impact sur la lymphopoïèse B des deux modèles, bien que similaire, pourrait avoir des causes partiellement différentes. Cependant, il est à noter que les souris HU présentent un plus grand nombre de cellules pré-B, suggérant

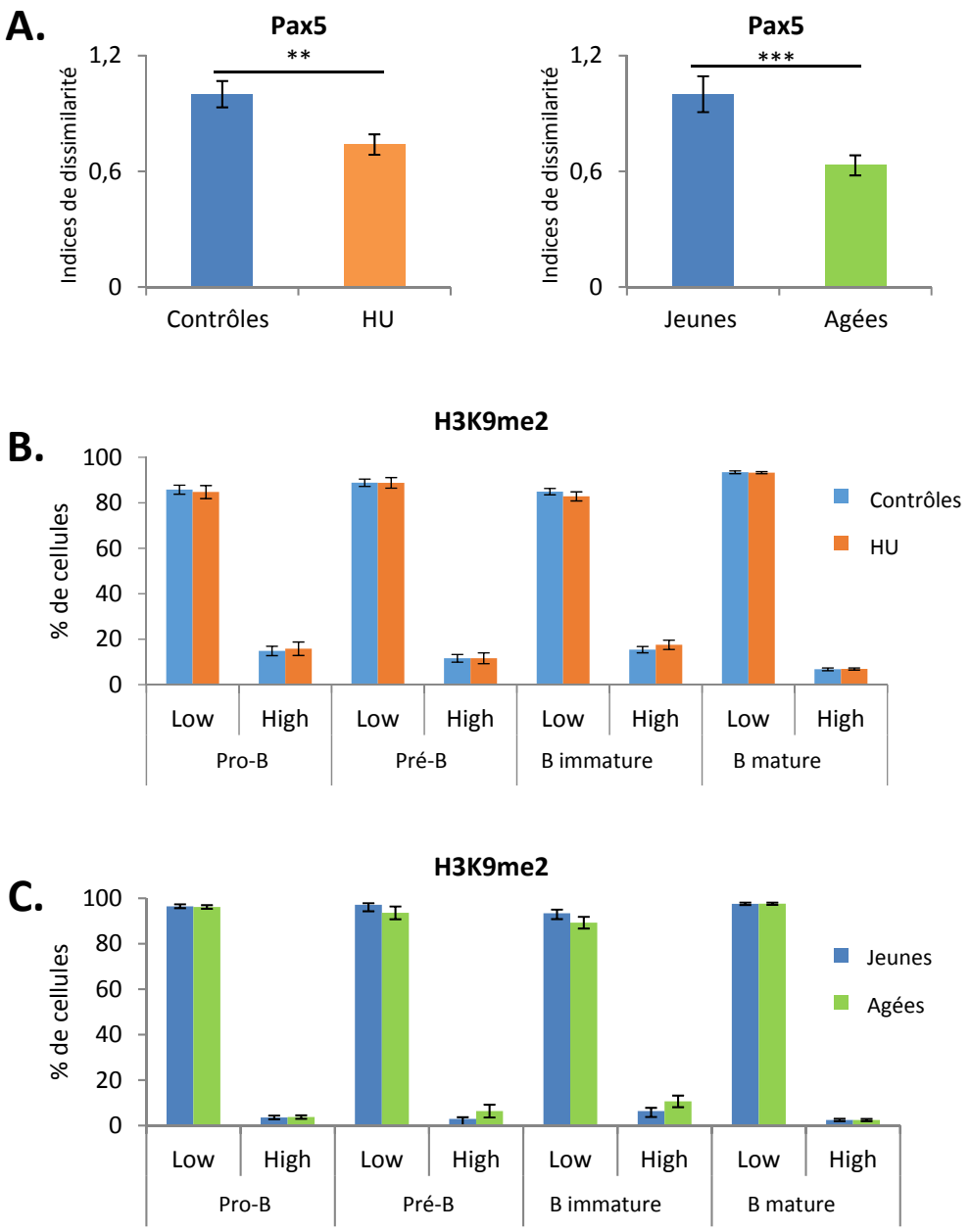


Figure 42 : Expression transcriptionnelle de Pax5 dans les cellules de moelle osseuse et taux de H3K9me2 au cours de la lymphopoïèse B

A. Analyse de l'expression des ARNm codant Pax5 dans les cellules de moelle osseuse provenant de souris HU (graphique de gauche) et âgées (graphique de droite) comparée à leur témoins respectifs.

B. et C. Taux de H3K9me2 en fonction des différents stades de maturation des cellules B chez les souris HU (**B.**) et âgées (**C.**) comparé à leur témoins respectifs. Deux populations de cellules B se distinguent en fonction de l'intensité d'expression de H3K9me2, la population low (faible taux de H3K9me2) et la population high (fort taux de H3K9me2).

Les écarts-types sont représentés sur les graphiques. Analyse statistique : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

que ce modèle impacterait plus faiblement la lymphopoïèse B par rapport au vieillissement, et par conséquent certains phénomènes pourraient être plus difficilement identifiables.

4.3- Impacts du vieillissement et du modèle HU sur le répertoire BCR

Les stades de la lymphopoïèse B fortement impactés dans nos deux modèles sont les stades où ont lieu la recombinaison V(D)J et la sélection de la chaîne lourde d'IgH. Nous avons donc étudié l'impact de ces modèles sur le répertoire des chaînes lourdes d'IgH et sur les acteurs de la recombinaison V(D)J.

4.3.1- Vieillissement et recombinaison V(D)J

Les analyses réalisées sur les séquences des chaînes lourdes d'IgH nous ont permis de montrer que la recombinaison V(D)J est globalement impactée par le vieillissement. En effet, nous avons pu observer une modification des activités enzymatiques de RAG1/2, Artémis et TdT, ainsi que des modifications dans le choix des segments VH et D.

Comme nous l'avons vu ci-avant, la modification de l'expression de RAG2 et de l'activité enzymatique du complexe RAG1/2 pourrait être liée à la modification du microenvironnement médullaire avec l'âge et non pas à des modifications intrinsèques des cellules B vieillissantes (Labrie et al. 2004). De plus, les facteurs de transcription E2A et EBF1, qui favorisent l'expression des gènes codant pour RAG1 et RAG2 (Kee and Murre 1998; Medina and Singh 2005), sont diminués avec l'âge (Lescale et al. 2010; R. L. Riley 2013). L'ensemble de ces éléments pourrait expliquer les effets observés sur la précision de coupure du complexe RAG1/2 au cours du vieillissement.

Dans le cas d'Artémis, nos données suggèrent une augmentation du nombre de nucléotides P au cours du vieillissement. Sur le plan fonctionnel, bien que cette augmentation pourrait contribuer à une augmentation de la diversité du répertoire, cette idée est à nuancer. En effet, le syndrome d'immunodéficience combinée sévère (SCID) est associée à une augmentation du nombre de nt P entre les segments D et JH (Mirjam van der Burg et al. 2007).

De plus, nous avons observé une augmentation du nombre de nt non génomiques ajoutés par la TdT, malgré la diminution de son expression transcriptionnelle. Cette diminution est en accord avec les données de Phawa et ses collaborateurs, qui ont aussi observé un déclin de la

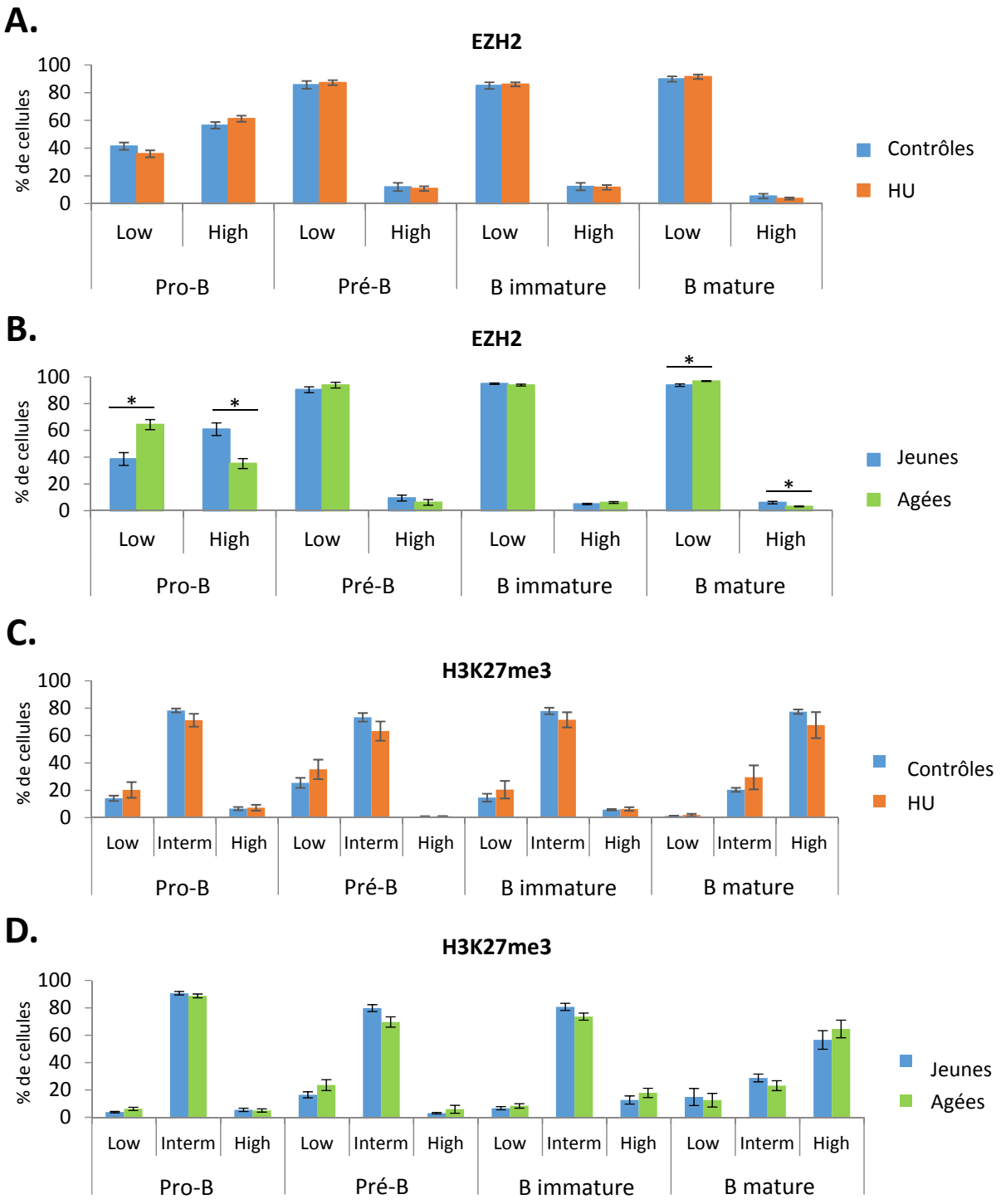


Figure 43: Taux d'EZH2 et de H3K27me3 au cours de la lymphopoïèse B

A. et **B.** Taux protéique d'EZH2 en fonction des différents stades de maturation des cellules B chez les souris HU (**A.**) et âgées (**B.**) comparé à leur témoins respectifs. Deux populations de cellules B de distinguent en fonction de l'intensité d'expression d'EZH2, la population low (faible taux d'EZH2) et la population high (fort taux d'EZH2).

C. et **D.** Taux de H3K27me3 en fonction des différents stades de maturation des cellules B chez les souris HU (C.) et âgées (D.) comparé à leur témoins respectif. Trois populations de cellules B se distinguent en fonction de l'intensité de marquage de H3K27me3, la population low (faible taux de H3K27me3), la population interm (taux intermédiaire de H3K27me3) et la population high (fort taux de H3K27me3).

Les écarts-types sont représentés sur les graphiques. Analyse statistique : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

TdT avec l'âge (Pahwa et al. 1981). Cependant, il faut souligner que la quantification de l'expression de la TdT a été effectuée sur les cellules totales de la moelle osseuse et pourrait donc uniquement traduire la diminution du nombre de cellules exprimant celle-ci. Sur le plan fonctionnel, une étude a montré que la déficience en TdT augmente la protection des souris contre les maladies auto-immunes comme le lupus (Conde et al. 1998). Il est donc possible que l'augmentation de nt N observée chez les souris âgées puisse être néfaste.

Nous ne pouvons pas exclure que l'ensemble des modifications des empruntes enzymatiques observées ne puissent pas être liées exclusivement à une modification directe de leur activité. En effet, une modification des segments VH et D accessibles à la recombinaison (l'utilisation de ceux-ci étant modifiée chez les souris âgées) pourrait aussi expliquer ces modifications d'empruntes. En accord avec cette hypothèse, des travaux menés sur les nt P retrouvés dans la chaîne TCRβ ont montré que la proportion des nt P est dépendante du type de segment génique recombiné suggérant ainsi que le choix des segments recombinés influence le nombre de nt P aux extrémités des jonctions codantes (Srivastava and Robins 2012).

Enfin, en accord avec l'augmentation du nombre de nt N, de nt P et de la variation des segments géniques recombinés, nous avons observé que la taille du CDR3 (site de liaison à l'Ag) des souris âgées est augmentée d'environ 2 acides aminés.

Ainsi, l'ensemble des modifications observées chez les souris âgées suggère l'existence d'une modification de la séquence en acide aminé de la région de CDR3. De façon intéressante, il est aujourd'hui connu que la taille et les propriétés physicochimiques des acides aminés composant le CDR3 influencent les processus de sélection lors de la lymphopoïèse B (Dunn-Walters 2016). Il est possible qu'avec l'âge les processus de sélection soient affectés et que des cellules B avec des CDR3 plus longs passent à travers les sélections, ce qui conduirait à une modification probable de la reconnaissance des Ag. Sur le plan fonctionnel, il a été montré que les cellules B1-a autoréactives sont associées à des Ac dont la longueur du CDR3 est augmentée (Schettino et al. 1997), il serait donc possible que la longueur augmentée du CDR3 chez les souris âgées soit associée à une augmentation de récepteurs autoréactifs. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de comparer les séquences en aa des CDR3 avec des séquences de CDR3 connues pour être autoréactives ou impliquées dans d'autres pathologies liées au vieillissement.

Globalement, l'ensemble de ces résultats (nt P, nt N et longueur du CDR3), par comparaison avec des études de structure ou d'activité de la recombinaison V(D)J dans des pathologies,

suggèrent un effet négatif sur la qualité du répertoire BCR et donc sur la réponse immunitaire. Ces données sont en accord avec les observations faites chez les personnes âgées qui présentent souvent une diminution globale de la qualité de la réponse immunitaire (Weiskopf, Weinberger, and Grubeck-Loebenstein 2009; Weyand and Goronzy 2016).

Sur le plan mécanistique, les modifications des activités enzymatiques et des choix des segments géniques pourraient être expliquées par une modification de la structure chromatinienne. En effet, plusieurs études ont montré que les modifications post-traductionnelles des histones participent aux choix des segments (C.-R. Xu et al. 2008; Subrahmanyam et al. 2012) et à la fixation sur la chromatine de RAG2 (Liu et al. 2007; Matthews et al. 2007). En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que l'utilisation des segments VH médians (diminution de la fréquence) et proximaux (augmentation de la fréquence) sont affectés par le vieillissement. De plus, plusieurs études ont montré qu'avec l'âge les différents mécanismes impliqués dans le remodelage de la chromatine, comme la méthylation de l'ADN ou les modifications post-traductionnelles des histones, sont modifiés (Sierra, Fernández, and Fraga 2015; Ucar and Benayoun 2018). Cependant l'étude globale des modifications H3K27me3 et H3K9me2 n'a pas permis de mettre en évidence de variations au cours du vieillissement, mais cela n'exclut pas l'existence de variations locales de la répartition de ces marques au niveau du locus IgH. En effet, le taux d'EZH2, dont la diminution conduit à l'expression des VH proximaux (C.-R. Xu et al. 2008), est réduit dans les cellules pro-B des souris âgées en association avec une augmentation des VH correspondant. De plus, la déficience de Pax5, dont l'expression est diminuée chez les souris âgées, réduit considérablement le taux de H3K27me3 au niveau des segments VH proximaux, augmentant leur expression et réduisant celle des VH distaux (Xu et al., 2008). Dans notre cas, nous n'avons pas observé de diminution de l'utilisation globale des VH distaux. Ceci s'explique par la très faible expression (0,23 % pour VH1-47 et 0,009% pour VH 8-5) des VH distaux étudiés par Xu et al. dans nos groupes de souris. Ainsi, la diminution de Pax5 et d'EZH2 pourrait avoir un effet local sur la structure chromatinienne et donc sur l'expression des VH médians et proximaux. A l'avenir, il serait intéressant d'étudier la méthylation des histones au niveau local, en différenciant les trois régions VH. Il est à noter que de nombreuses autres modifications des histones ont été décrites au niveau du locus IgH comme H3K36me2, H3K4me3, etc, (Liu et al. 2007; C.-R. Xu et al. 2008).

Tableau 9: Comparaison récapitulative des effets du modèle HU et du vieillissement

		Effets du modèle HU	Effets du vieillissement
Concentration de corticostérone sérique		Pas d'effet	↘ de la concentration
Lymphopoïèse B		-↘ des cellules pro-B -↘ des cellules pré-B -↘ des cellules B immatures (mais NS) -↘ des cellules B matures	-↘ des cellules pro-B -↘ des cellules pré-B -↘ des cellules B immatures -↗ des cellules B matures
Effecteurs de la recombinaison V(D)J	RAG	-pas d'effet sur l'expression transcriptionnelle de RAG1 -fidélité du site de coupure au niveau des segments V, D et J non affectée	-↘ de l'expression de RAG1 -fidélité du site de coupure au niveau des segments V, D et J affectée
	TdT	-pas d'effet sur l'expression transcriptionnelle -ajout de nt non génomiques non modifié	-↘ de l'expression transcriptionnelle -↗ de l'ajout de nt non génomiques
	Artemis	-pas d'effet sur l'expression transcriptionnelle -modification du nombre de nt palindromiques entre les segments VH et D -pas de modification du nombre de nt palindromiques entre les segments D et JH	-pas d'effet sur l'expression transcriptionnelle - pas de modification du nombre de nt palindromiques entre les segments VH et D -diminution du nombre de nt palindromiques entre les segments D et JH
Répertoire BCR	Segments VH	-fréquence familles VH non altérée -variation de l'utilisation des VH distaux -pas de variation de l'utilisation des VH médians et proximaux -fréquence segments VH majoritaires non altérée	-↗ fréquences familles VH1, VH5 et VH14 -↘ fréquences familles VH3, VH4, VH7, VH10 et VH13 -variation de l'utilisation des VH distaux, médians et proximaux -modifications de l'utilisation des VH majoritaires
	Segments D	-variation faible dans la fréquence d'utilisation des segments D	-variation forte dans la fréquence d'utilisation des segments D
	Segments JH	Aucun effet	
	Longueur CDR3	-pas d'effet sur la taille du CDR3	-↗ de la taille du CDR3
Remodelage chromatinien	EZH2	-pas de modification de l'expression au cours de la lymphopoïèse B	-↘ expression de EZH2 dans les cellules pro-B
	Pax5	-↘ expression transcriptionnelle dans les cellules de moelle osseuses	
	H3K27me3 H3K9me2	Profil de méthylation inchangé au cours de la lymphopoïèse B	

: Effets similaires

En conclusion, le vieillissement est associé à de nombreuses modifications au sein du répertoire BCR qui pourraient s'expliquer par des différences au niveau de l'activité des effecteurs de la recombinaison V(D)J ainsi que par la modification du remodelage chromatinien au niveau du locus IgH.

4.3.2- Modèle HU et recombinaison V(D)J

Comme nous l'avons déjà vu, le modèle HU semble impacter de manière similaire au vieillissement le développement des cellules B. Nous avons donc effectué sur les souris HU les mêmes analyses que sur les souris âgées. Globalement, peu de modifications liées au modèle HU ont été trouvées dans l'ensemble des analyses effectuées, excepté pour les palindromes, l'utilisation des segments au sein des VH distaux, des segments D et la diminution de Pax5. Ainsi, certaines des modifications observées chez les souris âgées sont retrouvées chez les souris HU. L'absence d'une similitude plus importante entre les deux modèles pourrait être expliquée par la durée des traitements. Les souris vieillissent pendant 18 mois, tandis que les souris HU, âgées de 8 semaines au début de l'expérience, sont traitées pendant seulement 21 jours.

4.4- Le modèle HU peut-il être considéré comme un modèle de vieillissement accéléré de la lymphopoïèse B ?

Les effets du modèle HU et du vieillissement que nous avons observés au cours de notre étude sont résumés dans le tableau 9. De manière générale, la suspension anti-orthostatique de 21 jours ne semble pas avoir d'effets importants sur le processus de recombinaison V(D)J et le répertoire BCR comparé au vieillissement. Comme nous l'avons dit ci-avant, cette différence pourrait être due au choix du temps de suspension. Ce choix de 21 jours a été défini par similitude avec les temps de vol moyen des astronautes qui est d'environ 6 mois (Dutta and Sengupta 2016). En effet, 6 mois de la vie chez l'homme correspondraient à environ 21 jours chez la souris. Cependant, la durée de vie des cellules B naïves entre l'Homme et la souris est équivalente et est d'environ 5-6 semaines (Fulcher and Basten 1997; D. D. Jones, Wilmore, and Allman 2015; Macallan 2005). Il est donc possible que le temps de suspension soit trop court pour nous permettre de détecter des différences au niveau du répertoire BCR et du

processus de recombinaison V(D)J. Ceci est confirmé par les travaux de Cabahug-Zuckerman et al, qui ont montré que la perte d'ostéoblastes est proportionnelle à la durée de la suspension (Cabahug-Zuckerman et al. 2016). En accord avec ces travaux, la perte osseuse engendrée par la suspension anti-orthostatique de 21 jours est plus faible que celle observée chez les souris âgées (Lescale et al. 2015).

5- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, pour valider le modèle HU en tant que modèle de vieillissement accéléré de la lymphopoïèse B, il faudrait réaliser une cinétique de suspension anti-orthostatique de plus de 21 jours, et analyser la perte osseuse des souris afin de déterminer le temps optimal pour se rapprocher le plus de la perte osseuse observée chez les souris âgées. Ensuite, des analyses de la lymphopoïèse B et du répertoire BCR devraient être réalisées et comparées aux données de cette étude. Cela nous permettrait également d'étudier l'évolution du répertoire BCR au cours du remodelage osseux.

CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

A l'heure où la conquête spatiale est en plein essor, il est bien établi que les vols spatiaux sont source de nombreux stress, physiques ou psychosociaux, qui induisent un affaiblissement du système immunitaire pouvant conduire à la survenue ou à l'aggravation de pathologies (Gerald Sonnenfeld, Butel, and Shearer 2003). De plus, l'importance des effets des vols spatiaux sur le système immunitaire dépend de la durée des missions. Celles-ci seront plus longues à l'avenir (mission vers Mars). Il est donc nécessaire de caractériser les mécanismes responsables du dérèglement immunitaire chez les astronautes afin d'élaborer des contre-mesures permettant de préserver leur santé. Or, l'étude du système immunitaire des astronautes est limitée par la rareté et le type d'échantillons qu'il est possible de prélever sur l'Homme en vol. C'est pourquoi les chercheurs ont développé différents modèles animaux en fonction du système biologique étudié. Durant ma thèse, j'ai étudié trois modèles animaux différents, l'amphibien *P. waltl*, le modèle murin de suspension anti-orthostatique et le modèle murin CUMS qui fait appel à des stress chroniques imprévisibles, multiples, sociaux et environnementaux. Chacun de ces modèles présente un intérêt particulier dans le domaine de l'immunologie spatiale.

De manière intéressante, l'amphibien urodèle *P. waltl* partage de nombreuses caractéristiques de l'immunité adaptative avec l'Homme notamment dans le mécanisme de recombinaison V(D)J (M. D. Cooper and Alder 2006; Frippiat 2013; Schenten et al. 2013). Des études menées précédemment au laboratoire sur des *P. waltl* immunisés à bord de la station Mir, ont montré que l'utilisation des segments IGHV et les hypermutations somatiques des immunoglobulines sont affectées par les vols spatiaux (Bascove et al. 2009, 2011). Cependant, plusieurs publications ont suggéré que la diversité du répertoire d'anticorps serait limitée chez les urodèles, ces données rendant celles obtenues sur le plan spatial plus difficilement applicables à l'Homme. Ainsi, durant ma thèse, j'ai étudié les répertoires de chaînes lourdes d'IgY et d'IgM de *P. waltl* et j'ai ainsi pu montrer qu'ils présentent une diversité qui est similaire à celle des IgA de mammifères pour IgY et à celle observée chez les têtards anoures et les axolotls adultes pour les IgM (Fonte et al. 2015). L'ensemble de ces caractéristiques font de *P. waltl* un bon modèle pour étudier les effets d'un vol spatial sur le système immunitaire humoral. Suite à ces résultats, et sachant qu'aucune étude ne s'est portée sur l'effet d'un vol

spatial sur le développement des lymphocytes et les mécanismes associés, notre laboratoire a élaboré un projet international, sélectionné par l'Agence Spatiale Européenne (ESA), en collaboration avec une équipe Belge et une équipe Russe. Ce projet, nommé AbDIV pour « Creation of antibody diversity under spaceflight conditions », a pour objectif de déterminer si la création du répertoire d'anticorps, les effecteurs de la recombinaison V(D)J et des marqueurs de la lymphopoïèse B sont affectés par les conditions spatiales chez *Xenopus laevis*. Le xénope présente des avantages supplémentaires par rapport au pleurodèle car il se développe plus rapidement et son immunité humorale a déjà été bien caractérisée (Du Pasquier et al. 2000; Marr et al. 2007). Pour ce projet, des embryons de xénopes se développeront à bord de la Station Spatiale Internationale (ISS). Au retour sur Terre, le répertoire d'anticorps des têtards sera étudié par séquençage haut-débit. Une étude par microarray (puces à ADN) permettra également de savoir si les effecteurs impliqués dans la recombinaison V(D)J et le développement des lymphocytes B, et donc la lymphopoïèse B, sont affectés en vol. Le principal avantage du modèle amphibien est qu'il nécessite peu de moyens matériels pour sa reproduction, son développement et son élevage, contrairement aux souris qui demandent beaucoup plus de soins. L'étude de ces amphibiens à bord de la station spatiale est donc très appréciée par la communauté scientifique (Frippiat 2013). En revanche, même si ce modèle animal est un bon modèle d'étude dans le domaine spatial, il reste tout de même génétiquement plus éloigné de l'Homme que d'autres modèles mammifères comme la souris (Flajnik and Kasahara 2010). C'est pourquoi le modèle murin est plus fréquemment utilisé au sol pour étudier les effets des stress rencontrés lors de vols spatiaux sur le système immunitaire.

Lors d'un vol, les astronautes sont soumis à une combinaison de stress chroniques. Il n'est donc pas possible de discriminer lequel impact plus ou moins le système immunitaire et par quel(s) mécanisme(s). Par contre, plusieurs modèles terrestres existent afin d'étudier l'impact de ces stress de façon indépendante. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé d'une part le modèle CUMS pour mimer les stress socio-environnementaux, et d'autre part le modèle HU pour simuler la microgravité. L'utilisation de ces deux modèles nous a permis d'analyser l'impact de deux grands types de stress sur la recombinaison V(D)J et la diversité des répertoires de récepteurs à l'Ag. Dans les deux cas nous avons pu constater des modifications de ces répertoires de récepteurs.

Nous avons montré que le modèle CUMS, appliqué durant la gestation, modifie 25% du répertoire TCRβ des souriceaux nouveau-nés et que ceux-ci présentent des CDR3 plus autoréactifs (Fonte et al., 2019), alors qu'une exposition à l'hypergravité durant la gestation induit une modification de 85% de ce répertoire chez la progéniture (Ghislin et al. 2015). Il apparaît donc qu'un changement de la force gravitaire (hypergravité dans ce cas) ait plus d'impact que les stress socio-environnementaux. Cependant, malgré le faible impact des stress socio-environnementaux, ces variations pourraient modifier l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, le laboratoire a montré que le modèle CUMS induit une augmentation des IgA sériques, une réduction de la masse splénique et une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires chez des souris adultes, observations qui sont similaires à celles faites en vol (Gaignier et al. 2018). Le faible impact du modèle CUMS pourrait être lié au temps de traitement et au fait que nous travaillons sur des souriceaux nouveau-nés qui présentent un répertoire moins complexe que celui des souris adultes. Ainsi, pour déterminer si ce modèle peut avoir un impact plus important, il serait intéressant de réaliser une expérience similaire à la nôtre mais en augmentant le temps d'exposition au-delà de la gestation. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer si ce modèle a également un impact sur le répertoire BCR afin de savoir si des stress chroniques socio-environnementaux sont susceptibles de modifier le répertoire de récepteurs aux antigènes des lymphocytes B et T. Ce dernier point n'était malheureusement pas réalisable techniquement sur des souriceaux de cet âge. Pour adresser cette question, il sera nécessaire de mettre au point une technique permettant de prélever les cellules de la moelle osseuse des tibias et des fémurs des souriceaux qui sont nettement plus petits et plus fragiles que ceux des souris adultes. L'analyse du répertoire BCR se fera ensuite par la même approche technique que celle utilisée pour les souris adultes.

L'étude de l'impact de la micropesanteur, *via* le modèle HU, sur le répertoire BCR a montré que l'exposition de souris adultes à ce modèle pendant 3 semaines a peu d'effet malgré la diminution de la lymphopoïèse B observée. Sachant que Lescale et al. ont observé un effet sur le volume osseux moindre chez les souris HU que chez les souris âgées (Lescale et al. 2015), il est possible que la durée d'exposition de 3 semaines soit trop faible pour détecter des différences notables. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que le

vieillissement, qui induit une perte osseuse plus forte, diminue la lymphopoïèse B et impacte fortement le répertoire BCR. A l'avenir, il serait donc nécessaire de réaliser une cinétique de suspension anti-orthostatique de plus de 21 jours afin de déterminer le temps optimal pour observer des effets notables sur la lymphopoïèse B et le répertoire BCR. Il est cependant intéressant de noter que des données publiées par le laboratoire ont montré que la réponse lymphoproliférative des cellules B de la rate est diminuée chez des souris adultes soumises au modèle HU durant 3 semaines (Gaignier et al., 2014), suggérant que cette durée d'exposition a déjà un impact sur les lymphocytes B matures. De plus, le modèle HU pourrait également induire des modifications de la lymphopoïèse T puisque nous avons constaté une diminution de la masse du thymus ainsi que du nombre de cellules T dans la rate de souris soumises au modèle HU (Gaignier et al., 2014).

En conclusion, les données obtenues avec le modèle CUMS et avec le modèle HU montrent que les stress physiques et socio-environnementaux peuvent conduire à des modifications de la lymphopoïèse et des répertoires de récepteurs à l'Ag, ce qui contribue probablement aux perturbations immunitaires observées chez certains astronautes au cours de missions spatiales (B. Crucian et al. 2016; Kimzey 1977). Il faut souligner que le choix du modèle animal est très important selon l'étude envisagée. Chaque modèle animal présente des avantages et des inconvénients et ne sera jamais totalement représentatif de ce qui se passe chez l'Homme. D'autant plus dans le cas de l'étude des effets de stress chroniques qui mettent en jeu différents systèmes biologiques interagissant étroitement entre eux.

Bien que le système immunitaire de la souris soit similaire à celui de l'Homme, il est nécessaire de confirmer nos conclusions chez l'humain. Pour cela, plusieurs approches sont actuellement développées, d'une part, *via* l'étude du répertoire BCR d'astronautes et d'autre part, *via* un projet européen sélectionné par l'ESA et utilisant le modèle « Bed Rest ».

Les données en cours d'obtention dans le cadre de l'étude du répertoire BCR à partir d'échantillons de sang provenant d'astronautes ayant volé à bord de l'ISS durant 6 mois, suggèrent que celui-ci serait partiellement impacté par le vol, de manière plus ou moins importante selon les individus. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues en utilisant le modèle HU.

Par ailleurs, l'équivalent humain du modèle HU, appelé « Bed Rest », consiste à aliter des personnes pendant 2 mois. Il a été montré que l'alitement, comme le modèle HU, induit une fonte musculaire et de l'ostéoporose (Dirks et al. 2016; Donaldson et al. 1970; Rittweger et al. 2006). Dans le cadre de ce projet international, le laboratoire a décidé d'étudier l'impact de ce modèle « Bed Rest » sur les sous-populations périphériques de lymphocytes B et sur le répertoire d'anticorps à partir de prélèvements de sang chez les volontaires sains enrôlés dans cette étude. Nous allons également évaluer l'efficacité d'une supplémentation en substances anti-inflammatoires et antioxydantes, proposées par l'ESA, afin de déterminer si ces molécules constituent une contre-mesure efficace pour prévenir l'affaiblissement du système immunitaire associé aux vols spatiaux. La phase clinique de ce projet vient de se terminer. Nos premiers résultats montrent que le « Bed Rest » diminue le nombre de cellules souches hématopoïétiques et le nombre de cellules B activées dans le sang périphérique mais n'affecte pas le nombre de lymphocytes B naïfs et mémoires. En revanche, la supplémentation induit une augmentation des lymphocytes B naïfs et mémoires pendant l'alitement. Ainsi, ces premiers résultats suggèrent qu'en absence de supplémentation, l'immunité humorale pourrait être affectée. L'étude du répertoire BCR apportera des données supplémentaires qui permettront de préciser cette conclusion.

Les connaissances qui émergeront de ces recherches seront nécessaires pour mieux comprendre les risques encourus lors des futures missions spatiales de longues durées et développer des contre-mesures pharmacologiques ou nutritionnelles pour préserver le système immunitaire des astronautes.

Il est important de noter que l'étude des effets des stress chroniques rencontrés lors d'un vol spatial présente également un intérêt pour les personnes vivant sur Terre. En effet, certaines modifications immunologiques rapportées suite à une exposition à des stress chroniques, ou un vol spatial, sont également observées chez les personnes âgées, suggérant que les conditions de stress chroniques pourraient conduire à un vieillissement prématuré du système immunitaire (Bauer, Jeckel, and Luz 2009; Bauer et al. 2013; Segerstrom and Miller 2004). C'est d'ailleurs le cas chez les souris soumises au modèle HU qui présentent une modification de la structure osseuse ainsi qu'une altération de la lymphopoïèse B similaires à celles observées chez les souris âgées (Lescale et al. 2015). L'étude des modèles de stress chroniques, comme le modèle de suspension anti-orthostatique et le modèle CUMS qui mime

les contrariétés quotidiennes, pourrait permettre d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes responsables de l'immunosénescence rencontrée chez les personnes âgées ou de l'affaiblissement immunitaire observé chez les personnes soumises à des stress chroniques.

Le modèle humain « Bed Rest » a aussi un intérêt sociétal puisque son utilisation pourrait permettre d'approfondir nos connaissances sur les modifications physiologiques observées chez des personnes alitées pour raisons médicales durant une longue durée. Dans ce cadre, il est à noter que la sédentarité est un des 10 principaux facteurs de risque de mortalité et progresse dans de nombreux pays, alourdissant la charge des pathologies associées et affectant la santé en général (OMS, aide-mémoire 384, 2017).

ANNEXES

RESUME CHAPITRE DE LIVRE

Les études concernant les effets des conditions spatiales sur le système immunitaire tendent à montrer que les stress rencontrés lors des vols spatiaux diminuent l'efficacité du système immunitaire favorisant ainsi la survenue de pathologies. En ce sens, il a par exemple été montré que 15 des 29 astronautes impliqués dans les missions Apollo ont développé des infections bactériennes ou virales pendant, immédiatement après ou dans la semaine suivant l'atterrissage (Kimzey 1977). Dans ce court chapitre de livre, nous présentons ce qui est connu quant aux effets des vols spatiaux sur le développement et les réponses des lymphocytes B, dont voici une synthèse.

1- Effets des conditions spatiales sur le développement des cellules B

La première étude suggérant que la lymphopoïèse B est affectée en vol a été menée avec l'amphibien *P. waltl*. Il a été montré que les quantités d'ARNm de chaînes lourdes d'IgM, de facteur de transcription Ikaros, déterminant les cellules lymphoïdes, et des membres NFκ-B, qui jouent un rôle crucial dans le développement des lymphocytes (Vallabhapurapu and Karin 2009), sont modifiées chez des embryons de pleurodèles soumis à des changements de forces gravitaires, suggérant une modification de la lymphopoïèse B (Huin-Schohn et al. 2013). Cette hypothèse a ensuite été confirmée par les travaux de Lescale et al. menés sur des souris C57/BL6 soumises à une suspension anti-orthostatique pendant 21 jours (Lescale et al. 2015). De façon intéressante, la diminution de la lymphopoïèse B, observée par Lescale et al., est très certainement liée à la perte osseuse induite par la suspension. Celle-ci modifie probablement la structure des niches osseuses indispensables à l'hématopoïèse. Ceci souligne l'importance de garder à l'esprit que tous les systèmes physiologiques interagissent au sein d'un organisme et que, par conséquent, les interconnexions entre systèmes doivent toujours être prises en compte.

2- Effets des conditions spatiales sur la réponse humorale

Les études initialement menées sur *P. waltl* ont montré que lorsque ceux-ci sont immunisés à bord d'une station spatiale, il y'a une augmentation de l'expression des IgY (homologues physiologiques des IgA humains) (Boxio, Dournon, and Frippiat 2005). Ces résultats sont en accord avec ceux de Konstantinova et al. qui ont aussi observé une augmentation des IgA chez les astronautes (Konstantinova et al. 1993). Des études plus approfondies des immunoglobulines impliquées dans la réponse humorale de ces *P.* waltl ont montré que les conditions spatiales modifient l'utilisation des différents segments IGHV qui constituent la région de reconnaissance à l'antigène (Bascove et al. 2009) et diminuent les hypermutations somatiques indispensables pour créer un répertoire d'anticorps suffisamment diversifié (Bascove et al. 2011). Ces résultats montrent que l'immunité humorale et la reconnaissance antigénique sont affectées lors de vols spatiaux.

De plus, il a été montré chez des souris soumises à une centrifugation de 2g ou 3g pendant 21 jours que la réponse proliférative des cellules B et T est diminuée (Guéguinou et al. 2012). Une diminution de 40 % de la réponse proliférative des lymphocytes B a également été observée chez des souris soumises à une suspension anti-orthostatique de 21 jours (Gaignier et al. 2014). Ces résultats montrent que les lymphocytes B sont sensibles aux changements de gravité.

3- Conclusions

Il apparaît donc que la réponse humorale est sensible aux conditions rencontrées lors des vols spatiaux. Du fait de l'augmentation de la durée des futures missions spatiales (missions vers Mars), il est nécessaire de comprendre les mécanismes impliqués dans les modifications immunologiques afin de développer des contre-mesures pharmacologiques ou nutritionnelles pour restaurer le système immunitaire et ainsi prévenir le développement ou l'aggravation de pathologies.

Ces recherches présentent également un intérêt pour les personnes vivant sur Terre. En effet, il est intéressant de noter que certains des changements immunitaires associés à l'âge sont observés chez les astronautes, suggérant que les facteurs de stress rencontrés lors des missions spatiales pourraient entraîner un vieillissement prématuré du système immunitaire.

CHAPITRE DE LIVRE

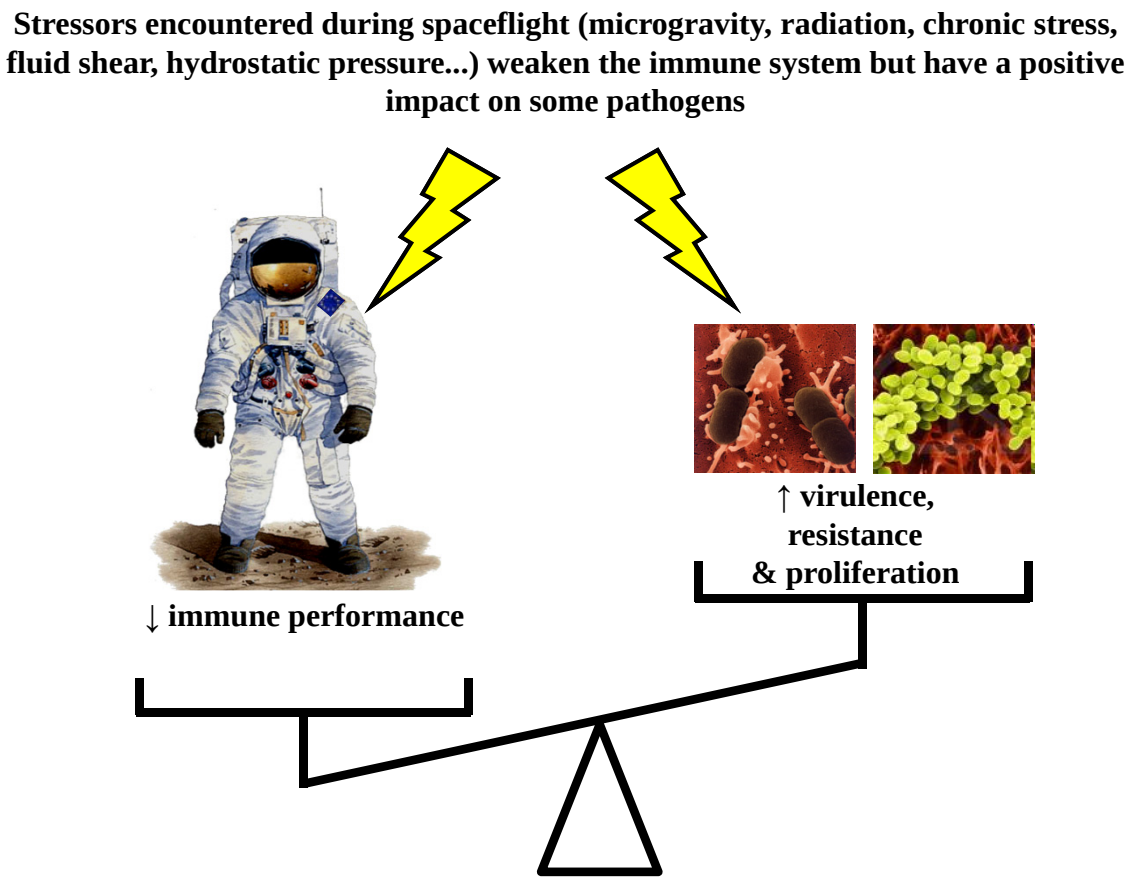


Fig. 15.1 Environmental changes (stressors) encountered during spaceflight weaken the immune system but can also increase the virulence, resistance and proliferation of some pathogens. This imbalance likely contributes to explain increased susceptibility to infections. Reprinted from Frippiat et al. (2016) with the permission of the Nature Publishing Group.

Part III

Stress and Immune Allostasis in Space, from Brain to Immune Responses

15 B-cell Immunology in Space

Coralie Fonte[a] and Jean-Pol Frippiat[a]

[a]Stress Immunity Pathogens Laboratory, EA 7300, Faculty of Medicine, Lorraine University. 9 Avenue de la Forêt de Haye. F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel: 00 33 3 72 74 62 86.
E-mails: coralie-fonte@univ-lorraine.fr; jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr

Abstract

Bioastronautic programs run over the last 50 years have shown that environmental conditions encountered during space missions reduce immunological competence. This chapter will review known effects on B-cell development and on the response of these antibody-producing cells under real or simulated space conditions. Comparison of changes affecting these cells with those previously reported in the elderly suggests that space missions could lead to premature aging of the immune system.

Keywords: spaceflight, B lymphopoiesis, B-cell response, antibody production, aging

Introduction

Spaceflight corresponds to a unique allostatic (over-) load (see Chapter 4) as by combination of stressors that can be classified in two main categories: chronic stressors (e.g. microgravity, confinement, isolation, circadian rhythm misalignment) and acute stressors encountered during periods of intense activity, such as dockings and extravehicular activities, but also during take-off and landing phases (hypergravity exposure). While acute stress has been described as beneficial (mobilization of individual's defense capabilities), chronic stress appears to have deleterious effects as several studies have shown that it contributes to many pathologies (reviewed in Godbout and Glaser 2006, see also Chapters 4 and 6). Studies performed on humans and animals returning from space travels have shown that this extreme environment has a negative impact on almost all physiological systems. It causes muscle atrophy, bone demineralization, cardiovascular and metabolic dysfunctions, alters cognitive processes and reduces immunological competence. Regarding this last point, it was shown that 15 of the 29 astronauts involved in Apollo missions developed bacterial or viral infections during, immediately after, or within one week of landing (Kimzey 1977). In addition, the first epidemiological study based on medical data collected on 46 astronauts who spent six months onboard the International Space Station (ISS), showed that 46% of them had to face immunological problems (Crucian et al. 2016). These observations demonstrate that, on

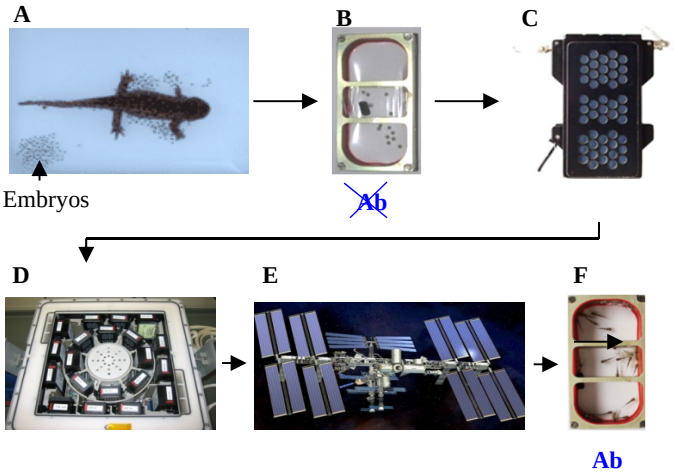


Fig. 15.2 Schematic presentation of the AMPHIBODY experiment performed onboard the ISS in 2006. Embryos of the urodele Amphian *P. waltl*, which do not yet produce antibodies (**A**), were placed in miniaquaria (**B**) that were inserted into Type 1 containers (**C**). These containers were loaded into the Kubik incubator (**D**) that was transported to the ISS (**E**). Embryos developed over a 10 day period in the space station. At landing, antibody-producing larvae were recovered (**F**). "Ab" stands for antibody. Reprinted from Frippiat (2013) with permission from Elsevier.

average, spaceflight affects the immune system of 50% of the astronauts and that immune dysregulations occur during spaceflight and not only after landing. They are therefore not exclusively due to the hypergravity phase associated to landing or to Earth gravity rehabilitation (Crucian et al. 2016).
In parallel of these immunological modifications, spaceflight-induced changes in microbial physiology have to be considered because some bacteria can take advantage of this extreme environment (see Chapter 18). For example, *Salmonella* cultured under real or simulated spaceflight conditions exhibited increased virulence, resistance and survival in macrophages (Nickerson et al. 2000). In addition, reduced activity of some antibiotics associated with variations in pharmacokinetics have been reported (Taylor and Sommer 2005; Klaus and Howard 2006). These observations, coupled with the weakening of the immune system, certainly contribute to explain why nearly 50% of the astronauts exhibit in-flight immunological alterations (Fig. 15.1).
In this chapter, we will focus on the effects of spaceflight on the development and the responses of B lymphocytes (Guéguinou et al. 2009; Frippiat et al. 2016).

Effects of spaceflight conditions on B-cell development

Cells that make up the immune system derive from hematopoietic stem cells that give rise to common myeloid progenitors (CMP) and common lymphoid progenitors (CLP). After several steps of differentiation, CMP generate myeloid cells (granulocytes, monocytes, macrophages, dendritic cells) while CLP generate lymphoid cells (B and T lymphocytes and Natural Killer cells).
Different studies have shown that spaceflight conditions affect lymphopoiesis (the development of lymphocytes) thanks to the use of different animal models: mouse and the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. The latter lends itself well to the constraints associated with space experiments and has all the cardinal elements of the mammalian immune system (Frippiat 2013). It can therefore be used to improve our understanding of the immunosuppressive effects of spaceflight. Using that animal model, it was shown that the expression of IgM immunoglobulin heavy chain, of the lymphoid-determining transcription factor Ikaros, and of NFκ-B members that play a crucial role in lymphocyte development (Vallabhapurapu and Karin 2009) are modified when amphibian embryos are subjected to gravity changes, suggesting a modification in B lymphopoiesis (Huin-Schohn et al. 2013) (Fig. 15.2). This hypothesis was then confirmed in C57/BL6 mice subjected to an anti-orthostatic suspension (HU for 'Hindlimb Unloading', a ground-based model frequently used to simulate the effects of spaceflight on rodents) for 21 days to mimic a long-duration mission at the human-scale. Indeed, it was shown that HU induces a decrease in both bone microstructure 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 in femoral bone marrow as of the CLP stage with a major block at the pro-B to pre-B cell transition (5-10 fold decrease) (Fig. 15.3) (Lescale et al. 2015). These reductions persisted during the 21-days period of suspension and were not due to stress because biochemical and behavioral studies have shown that mice adapt to HU in less than 3 days. Various studies have subsequently identified several causes of this B lymphopoiesis weakening such as a reduced expression of B-cell transcription factors (EBF and Pax5) and an alteration in STAT5-mediated IL-7 signaling, a signaling pathway required for the differentiation of B lymphocytes. This decrease in B lymphopoiesis is most certainly linked to suspension-induced osteoporosis because immune-competent B-cells derive from hematopoietic stem cells that reside in the bone marrow in specialized niches made up of bone and vascular structures, including bone forming osteoblasts and bone resorbing osteoclasts (Mercier et al. 2011). This hypothesis is supported by the fact that a doubling of the level of

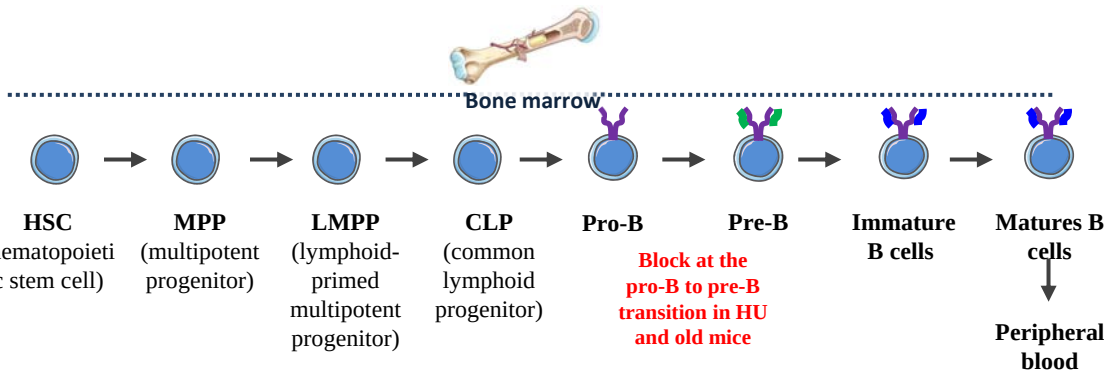


Fig. 15.3 Schematic presentation of B-cell development in the bone marrow (B lymphopoiesis). Antibody heavy chains appear at the pro-B stage (purple). At the pre-B stage, this chain is associated with a pseudo light chain (green) that will be replaced by a light chain (blue) in immature B-cells. Microgravity simulated by anti-orthostatic suspension (HU) and ageing weaken B lymphopoiesis as of the CLP stage with a major block at the pro-B to pre-B cell transition (Lescale et al. 2015).

progenitors and stem cells was observed in the blood of HU mice suggesting that the interactions between these cells and their niches are disrupted. This example highlight the importance of keeping in mind that all physiological systems interact within an organism and that consequently, interconnections between systems must always be considered.
Some of these observations were confirmed in C57/BL6 mice subjected to real microgravity during a 30-day flight onboard the Bion-M 1 biosatellite (April 19–May 19, 2013) (Andreev-Andrievskiy et al. 2014). Indeed, osteocyte death, which may trigger bone resorption and result in bone mass and microstructural deterioration, was noted at landing (Gerbaix et al. 2017). Furthermore, a decrease in the expression of proteins necessary for the maturation of B-cells, most probably at the pro-B to pre-B transition, were noted in these mice (J.-P.F., submitted paper).

Effects of spaceflight conditions on B-cell responses

To determine whether the humoral immune response is affected by spaceflight conditions, adult *P. waltl* were immunized during a five months stay onboard the Mir space station (Fig. 15.4). These animals are, until now, the only ones to have been immunized in space. At the same time, other *P. waltl* of the same age and gender were reared in the laboratory under the same conditions as those found in the space station and immunized with the same antigen. The quantification of IgY (the physiological counterpart of human IgA - Schaerlinger et al. 2008) and IgM heavy-chain mRNAs in the spleen of these animals revealed that the level of IgM transcription was unaffected in flown animals, while the level of IgY transcription was at least 3 times higher in the spleen of animals immunized onboard Mir (Boxio et al. 2005). These data support the increase of IgA previously noted in astronauts by Konstantinova et al. (1993). This increase could result from a change in the distribution of IgY-producing B-cells because it has been reported that spaceflight can modify the distribution of leukocytes. More detailed studies of these amphibian humoral responses revealed spaceflight-induced changes in the expression of the VHII and VHVI gene segment subgroups used to build specific antibodies in response to the antigenic challenge. VHII and VHVI subgroups were found in 28% and 58% of IgM heavy-chains from animals immunized on Earth, respectively, and in 61% and 24% of IgM heavy-chains from animals immunized onboard Mir. More precisely, it was shown that *P. waltl* that were immunized on Earth or in space used the same VHII gene segment to build their IgM heavy-chains but that the expression of this segment was two times higher under spaceflight conditions. It was also shown that animals immunized on Earth used four different VHVI gene segments to build their IgM heavy-chains, while animals immunized onboard Mir used only two of them. Strong decreases in the expression of IgM heavy-chain mRNAs encoded by the VHVI.A and VHVI.B segments were noted in flown animals (Bascove et al. 2009). These data indicate that flown animals expressed different Ig heavy-chain mRNAs by comparison to animals immunized on Earth. Finally, somatic hypermutations in heavy-chain variable domains (VH) of IgM antibodies were analyzed. Somatic hypermutations are important because they enable B lymphocytes to improve their antibody binding sites. To calculate the frequency of these mutations, cDNA sequences of IgM heavy-chain transcripts encoding VHII domains were aligned with the corresponding VHII germline sequence for each of the studied animals. This study revealed that somatic hypermutation occurs in space following immunization but at frequency two times lower than on Earth (Bascove et al. 2011). This observation suggests that antibody affinity maturation could be less efficient in space, thereby confirming the disruption of the humoral immune response under spaceflight conditions. This decrease in somatic hypermutation frequency likely results from the combination of several spaceflight-associated changes, such as the severe reduction in T cell activation, changes in cell-cell contacts, signal transduction, gene transcription, cytokine production and cytoskeleton organization. Of all

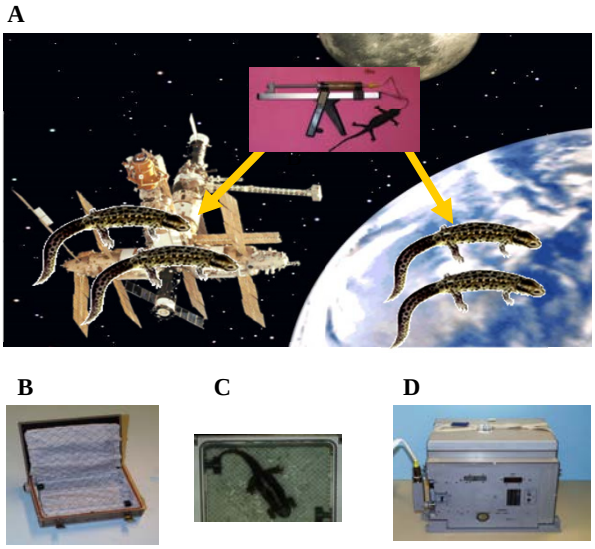


Fig. 15.4 Schematic presentation of the Genesis experiment performed in 1999. During that experiment adult *P. waltl* were immunized and reared during 5 months onboard the Mir space station (**A**). During their stay in the station, animals were force-fed using a syringe with a catheter. As controls, adult *P. waltl* were immunized and reared on Earth in the same conditions as onboard Mir. During that experiment, animals were kept in boxes on damp towels (**B** and **C**) that were placed inside the CTA ("Container de Transport Aller") (**D**) to regulate the temperature. Reprinted from Frippiat (2013) with permission from Elsevier.

these changes, those concerning the cytoskeleton are of particular interest because this structure is involved in many functions. It participates in cell mobility, signal transduction, gene expression and cell cycle. The cytoskeleton could therefore be one of the structures through which a cell detects a change in gravitational force (see Chapter 17).

In complement of these in-flight studies, the impacts of gravity changes on the immune system of adult mice were studied. Eight-week old male C57BL/6 mice were centrifuged for 21 days at 2 or 3g. A substantial increase in serum corticosterone (a stress hormone) concentration was observed at the end of the centrifugation in 3g mice, but not in 2g mice. In the same way, a significant increase in the level of anxiety, persisting for more than two weeks after the return to normogravity, was noted in 3g mice. A significant reduction in the proliferative response of B lymphocytes from 2g mice, but not from 3g mice, was associated to these changes. T lymphocyte proliferative responses fell at 2g and 3g but less sharply than for B cells. Together, these results suggest a breakdown in adaptation at 3g which takes the form of an increase in serum corticosterone, lasting anxiety and a reduction of the proliferative response of T lymphocytes whereas after 21 days at 2g, mice only show a lower response of their B and T lymphocytes. It therefore seems that at 2g, hypergravity on its own can affect the response of these two cell types (Guéguinou et al. 2012). On the other hand, when mice were subjected to HU during 21 days to simulate physiological changes observed in astronauts, no differences in serum corticosterone concentrations or in thymus and spleen masses were noted indicating adaptation. However, it appeared that the anti-orthostatic position led, in the absence of stress, to an inversion of the B/T lymphocyte ratio in mice's spleen and to a 40% weakening of B lymphocytes proliferative response (Gaignier et al. 2014) as was shown for 2g mice. Taken together, these results show that B lymphocytes are sensitive to changes in gravity, which could explain the greater sensitivity to pathogens previously reported for HU mice (Aviles et al. 2003).

To understand why B lymphocytes from mice exposed to gravitational stress have a poorer response to mitogen stimulation, it is of interest to look at neurohormone receptors present on these cells. Glucocorticoid receptors have been reported on B-cells (Gruver-Yates et al. 2014) and very recently corticotropin-releasing hormone receptors 2, CRHR2 (Harle et al. 2018). These receptors render B-cells directly sensitive to glucocorticoids and CRH produced when the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is activated by stress.

Similarities between spaceflight-induced modifications and aging

Aging profoundly impairs the immune system and is characterized by changes in hematopoiesis, adaptive and innate immunity. Thymus atrophy and the subsequent reduction in T-cell production are the most noticeable age-related events. Accelerated immune aging is also observed among individuals with high stress (Casaletto et al., 2018).

Interestingly, some of these age-associated changes are observed in astronauts who are subjected to numerous stressors during space missions. Indeed, increased susceptibility to infection and decreased response to vaccine (Sasaki et al. 2011), that may be correlated with impaired development and functions of B and T lymphocytes, have been observed in the elderly (Shaw et al. 2013). The development of these cells and their responses are also reduced when the gravitational force is modified (see above). HU rapidly induced modifications presenting many similarities with the changes observed in old mice both with regard to trabecular bone microarchitecture and to the cellular and molecular changes accompanying reduced B-cell differentiation (Lescale et al. 2015). Aging is accompanied by a decrease in antibody affinity (Sasaki et al. 2011) as shown in in-flight immunized *P. waltl* (Bascove et al. 2011). The use of antibody VH gene segments is modified during aging (Gibson et al. 2009) and in space (Bascove et al. 2009) which affects the diversity of the antibody repertoire. Taken together,

these observations suggest that stressors encountered during space missions could lead to premature aging of the immune system.

Conclusion and perspectives

On average, 50% of the astronauts are confronted to immunological problems during space missions. Our understanding of these dysfunctions has greatly progressed. However, the impact of long-term missions remains to be clarified. Indeed, most of our current knowledge has derived from space missions whose duration did not exceed six months. Moreover, since the homeostasis of the immune system is linked to that of other systems that are also affected by spatial conditions such as the musculoskeletal, nervous and cardiovascular systems, it will be necessary to study the impact of spaceflight conditions on these interconnections through interdisciplinary approaches.
Knowledge that will emerge from these researches will be necessary to, on the one hand, better understand the risks incurred during future long-term space missions, where the crew will be left on its own without the possibility of a quick return to Earth and, on the other hand, to develop pharmacological or nutritional countermeasures to restore the immune system to prevent the development or aggravation of pathologies. These researches are also of interest for people living on Earth since they could open therapeutic ways to treat immunosenescence and chronic stress-induced immune dysfunctional states.

Acknowledgments

JPF and his team were supported by the French National Space Agency (CNES), the European Space Agency (ESA), the French Ministry of Higher Education and Research, the Lorraine University and the Lorraine area.

References

Andreev-Andrievskiy A, Popova A, Boyle R Alberts J, Shenkman B, Vinogradova O, et al. Mice in Bion-M 1 space mission: training and selection. PLoS One. 2014;9:e104830. doi:10.1371/journal.pone.0104830.

Aviles H, Belay T, Fountain K, Vance M, Sonnenfeld G. Increased susceptibility to Pseudomonas aeruginosa infection under hindlimb-unloading conditions. J Appl Physiol. 2003;95:73-80.

Bascove M, Huin-Schohn C, Guéguinou N, Tschirhart E, Frippiat JP. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. FASEB J. 2009;23:1607-15. doi:10.1096/fj.08-121327.

Bascove M, Guéguinou N, Schaerlinger B, Gauquelin-Koch G, Frippiat JP. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. FASEB J. 2011;25:2947-2955. doi:10.1096/fj.11-185215.

Boxio R, Dournon C, Frippiat JP. Effets of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. J Appl Physiol. 2005; 98:905-10.Casaletto KB, Staffaroni AM, Elahi F, Fox E, Crittenden PA, You M, Neuhaus J, Glymour M, Bettcher BM, Yaffe K, Kramer JH. Perceived stress is associated with accelerated monocyte/macrophage aging trajectories in clinically normal adults. Am J Geriatr Psychiatry. 2018 in press. doi: 10.1016/j.jagp.2018.05.004.

Crucian B, Babiak-Vazquez A, Johnston S, Pierson DL, Ott CM, Sams C. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. Int J Gen Med. 2016;9:383-91. doi:10.2147/IJGM.S114188.

Frippiat JP. Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. Mol Immunol. 2013;56:434-41. doi:10.1016/j.molimm.2013.06.011.

Frippiat JP, Crucian BE, de Quervain DJF, Grimm D, Montano N, Praun S, et al. Towards human exploration of space: The THESEUS review series on immunology research priorities. NPJ Microgravity. 2016; 2:16040. doi:10.1038/npjmgrav.2016.40.

Gaignier F, Schenten V, De Carvalho Bittencourt M, Gauquelin-Koch G, Frippiat JP, Legrand-Frossi C. 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. 2014; 9: e92664. doi:10.1371/journal.pone.0092664.

Gerbaix M, Gnyubkin V, Farlay D, Olivier C, Ammann P, Courbon G, et al. One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons. Sci Rep. 2017;7:2659. doi:10.1038/s41598-017-03014-2.

Gibson KL, Wu YC, Barnett Y, Duggan O, Vaughan R, Kondeatis E, et al. B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status. Aging Cell. 2009;8:18-25. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00443.x.

Godbout JP, Glaser R. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. J Neuroimmune Pharmacol. 2006;1:421-27. doi:10.1007/s11481-006-9036-0.

Gruver-Yates AL, Quinn MA, Cidlowski JA. Analysis of glucocorticoid receptors and their apoptotic response to dexamethasone in male murine B cells during development. Endocrinology. 2014;155:463-74. doi:10.1210/en.2013-1473.

Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, Bueb JL, Tschirhart E, Legrand-Frossi C, et al. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? J Leukoc Biol. 2009;86:1027-38. doi:10.1189/jlb.0309167.

Guéguinou N, Bojados M, Jamon M, Derradji H, Baatout S, Tschirhart E, et al. Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice. Psychoneuroendocrinology. 2012; 37:137-47. doi:10.1016/j.psyneuen.2011.05.015.

Harlé G, Kaminski S, Dubayle D, Frippiat JP, Ropars A. Murine splenic B cells express corticotropin-releasing hormone receptor 2 that affect their viability during a stress response. Sci Rep. 2018;9:143. doi: 10.1038/s41598-017-18401-y.

Huin-Schohn C, Guéguinou N, Schenten V, Bascove M, Gauquelin-Koch G, Baatout S, et al. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. FASEB J. 2013; 27:333-41. doi:10.1096/fj.12-217547.

Kimzey SL. Hematology and immunology studies. In: Johnson RS, Dietlein LF, editors. Biomedical Results from Skylab. National Aeronautics and Space Administration, U.S. Goverment Printing Office, Washington D.C; 1977. pp 249-282.

Klaus DM, Howard HN. Antibiotic efficacy and microbial virulence during space flight. Trends Biotechnol. 2006;24:131-6. doi:10.1016/j.tibtech.2006.01.008.

Konstantinova IV, Rykova MP, Lesnyak AT, Antropova EA. Immune changes during long-duration missions. J Leukoc Biol. 1993;54:189-201

Lescale C, Schenten V, Djeghloul D, Bennabi M, Gaignier F, Vandamme K, et al. Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. FASEB J. 2015;29:455-63. doi:10.1096/fj.14-259770.

Nickerson CA, Ott CM, Mister SJ, Morrow BJ, Burns-Keliher L, Pierson DL. Microgravity as a novel environmental signal affecting Salmonella enterica serovar Typhimurium virulence. Infect Immun. 2000; 68:3147-52.

Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. Nat Rev Immunol. 2011;12:49-60.doi: 10.1038/nri3132.

Sasaki S, Sullivan M, Narvaez CF, Holmes TH, Furman D, Zheng NY, et al. Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. J Clin Invest. 2011;121:3109-19. doi: 10.1172/JCI57834.

Schaerlinger B, Bascove M, Frippiat JP. A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. Mol Immunol. 2008;45:776-86. doi:10.1016/j.molimm.2007.06.356.

Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. Nat Rev Immunol. 2013;13:875-87. doi: 10.1038/nri3547.

Taylor PW, Sommer AP. Towards rational treatment of bacterial infections during extended space travel. Int J Antimicrob Agents. 2005;26:183-7. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.06.002.

Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-B transcription factors in the immune system. Annu Rev Immunol. 2009;27:693-733. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelrasoul, Hend, Markus Werner, Corinna S. Setz, Klaus Okkenhaug, and Hassan Jumaa. 2018. "PI3K Induces B-Cell Development and Regulates B Cell Identity." *Scientific Reports* 8 (1): 1327. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19460-5.

Agata, Yasutoshi, Nobuyuki Tamaki, Shuji Sakamoto, Tomokatsu Ikawa, Kyoko Masuda, Hiroshi Kawamoto, and Cornelis Murre. 2007. "Regulation of T Cell Receptor β Gene Rearrangements and Allelic Exclusion by the Helix-Loop-Helix Protein, E47." *Immunity* 27 (6): 871–84. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.015.

Agrawal, Anshu, and Sudhir Gupta. 2011. "Impact of Aging on Dendritic Cell Functions in Humans." *Ageing Research Reviews* 10 (3): 336–45. https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.06.004.

Ahnesorg, Peter, Philippa Smith, and Stephen P. Jackson. 2006. "XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining." *Cell* 124 (2): 301–13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.031.

Aifantis, Iannis, Jan Buer, Harald von Boehmer, and Orly Azogui. 1997. "Essential Role of the Pre-T Cell Receptor in Allelic Exclusion of the T Cell Receptor β Locus." *Immunity* 7 (5): 601–7. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80381-7.

Alam, S. M., I. N. Crispe, and N. R. Gascoigne. 1995. "Allelic Exclusion of Mouse T Cell Receptor Alpha Chains Occurs at the Time of Thymocyte TCR Up-Regulation." *Immunity* 3 (4): 449–58.

Alamyar, Eltaf, Patrice Duroux, Marie-Paule Lefranc, and Véronique Giudicelli. 2012. "IMGT® Tools for the Nucleotide Analysis of Immunoglobulin (IG) and T Cell Receptor (TR) V-(D)-J Repertoires, Polymorphisms, and IG Mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS." In *Immunogenetics*, edited by Frank T. Christiansen and Brian D. Tait, 882:569–604. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-842-9_32.

Alarcon, B., B. Berkhout, J. Breitmeyer, and C. Terhorst. 1988. "Assembly of the Human T Cell Receptor-CD3 Complex Takes Place in the Endoplasmic Reticulum and Involves Intermediary Complexes between the CD3-Gamma.Delta.Epsilon Core and Single T Cell Receptor Alpha or Beta Chains." *The Journal of Biological Chemistry* 263 (6): 2953–61.

Albert, Paul. 2015. "Why Is Depression More Prevalent in Women?" *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 40 (4): 219–21. https://doi.org/10.1503/jpn.150205.

Alghadir, Ahmad H., Sami A. Gabr, and Einas Al-Eisa. 2015. "Physical Activity and Lifestyle Effects on Bone Mineral Density among Young Adults: Sociodemographic and Biochemical Analysis." *Journal of Physical Therapy Science* 27 (7): 2261–70. https://doi.org/10.1589/jpts.27.2261.

Al-Lazikani, B., A. M. Lesk, and C. Chothia. 1997. "Standard Conformations for the Canonical Structures of Immunoglobulins." *Journal of Molecular Biology* 273 (4): 927–48. https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1354.

Almagro, J. C., I. Hernandez, M. del Carmen Ramirez, and E. Vargas-Madrazo. 1997. "The Differences between the Structural Repertoires of VH Germ-Line Gene Segments of Mice and Humans: Implication for the Molecular Mechanism of the Immune Response." *Molecular Immunology* 34 (16–17): 1199–1214.

Amagai, T., M. Itoi, and Y. Kondo. 1995. "Limited Development Capacity of the Earliest Embryonic Murine Thymus." *European Journal of Immunology* 25 (3): 757–62. https://doi.org/10.1002/eji.1830250320.

Andersen, Mads Hald, David Schrama, Per thor Straten, and Jürgen C. Becker. 2006. "Cytotoxic T Cells." *Journal of Investigative Dermatology* 126 (1): 32–41. https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001.

Anderson, Mark S., Emily S. Venanzi, Ludger Klein, Zhibin Chen, Stuart P. Berzins, Shannon J. Turley, Harald von Boehmer, et al. 2002. "Projection of an Immunological Self Shadow within the Thymus by the Aire Protein." *Science (New York, N.Y.)* 298 (5597): 1395–1401. https://doi.org/10.1126/science.1075958.

Annunziato, Francesco, Chiara Romagnani, and Sergio Romagnani. 2015. "The 3 Major Types of Innate and Adaptive Cell-Mediated Effector Immunity." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (3): 626–35. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.001.

"Antibody Diversity." 2012. In *Immunology for Pharmacy*, 79–86. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06947-2.10010-0.

Arango Duque, Guillermo, and Albert Descoteaux. 2014. "Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases." *Frontiers in Immunology* 5 (October). https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491.

Arola, J., P. Heikkilä, R. Voutilainen, and A. I. Kahri. 1994. "Corticosterone Regulates Cell Proliferation and Cytochrome P450 Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme Messenger Ribonucleic Acid Expression in Primary Cultures of Fetal Rat Adrenals." *Endocrinology* 135 (5): 2064–69. https://doi.org/10.1210/endo.135.5.7956928.

Aviles, Hernan, Tesfaye Belay, Kimberly Fountain, Monique Vance, and Gerald Sonnenfeld. 2003. "Increased Susceptibility to Pseudomonas Aeruginosa Infection under Hindlimb-Unloading Conditions." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 95 (1): 73–80. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00968.2002.

Aw, Danielle, Lucy Hilliard, Yoshio Nishikawa, Emma T. Cadman, Rachel A. Lawrence, and Donald B. Palmer. 2016. "Disorganization of the Splenic Microanatomy in Ageing Mice." *Immunology* 148 (1): 92–101. https://doi.org/10.1111/imm.12590.

Bain, G., I. Engel, E. C. Robanus Maandag, H. P. te Riele, J. R. Voland, L. L. Sharp, J. Chun, B. Huey, D. Pinkel, and C. Murre. 1997. "E2A Deficiency Leads to Abnormalities in Alphabeta T-Cell Development and to Rapid Development of T-Cell Lymphomas." *Molecular and Cellular Biology* 17 (8): 4782–91.

Bain, G., E. C. Maandag, D. J. Izon, D. Amsen, A. M. Kruisbeek, B. C. Weintraub, I. Krop, M. S. Schlissel, A. J. Feeney, and M. van Roon. 1994. "E2A Proteins Are Required for Proper B Cell Development and Initiation of Immunoglobulin Gene Rearrangements." *Cell* 79 (5): 885–92.

Banks, W. A., A. J. Kastin, and R. D. Broadwell. 1995. "Passage of Cytokines across the Blood-Brain Barrier." *Neuroimmunomodulation* 2 (4): 241–48. https://doi.org/10.1159/000097202.

Baqai, Farnaz P., Daila S. Gridley, James M. Slater, Xian Luo-Owen, Louis S. Stodieck, Virginia Ferguson, Stephen K. Chapes, and Michael J. Pecaut. 2009. "Effects of Spaceflight on Innate Immune Function and Antioxidant Gene Expression." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 106 (6): 1935–42. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.91361.2008.

Barberis, A., K. Widenhorn, L. Vitelli, and M. Busslinger. 1990. "A Novel B-Cell Lineage-Specific Transcription Factor Present at Early but Not Late Stages of Differentiation." *Genes & Development* 4 (5): 849–59.

Barcellos-Hoff, Mary Helen, Eleanor A. Blakely, Sandeep Burma, Albert J. Fornace, Stanton Gerson, Lynn Hlatky, David G. Kirsch, et al. 2015. "Concepts and Challenges in Cancer Risk Prediction for the Space Radiation Environment." *Life Sciences in Space Research* 6 (July): 92–103. https://doi.org/10.1016/j.lssr.2015.07.006.

Barndt, R. J., M. Dai, and Y. Zhuang. 2000. "Functions of E2A-HEB Heterodimers in T-Cell Development Revealed by a Dominant Negative Mutation of HEB." *Molecular and Cellular Biology* 20 (18): 6677–85.

Barnes, P. J. 1998. "Anti-Inflammatory Actions of Glucocorticoids: Molecular Mechanisms." *Clinical Science (London, England: 1979)* 94 (6): 557–72.

Bascove, Matthieu, and Jean-Pol Frippiat. 2010. "Molecular Characterization of Pleurodeles Waltl Activation-Induced Cytidine Deaminase☆." *Molecular Immunology* 47 (7–8): 1640–49. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.01.005.

Bascove, Matthieu, Nathan Guéguinou, Bérénice Schaerlinger, Guillemette Gauquelin-Koch, and Jean-Pol Frippiat. 2011. "Decrease in Antibody Somatic Hypermutation Frequency under Extreme, Extended Spaceflight Conditions." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (9): 2947–55. https://doi.org/10.1096/fj.11-185215.

Bascove, Matthieu, Cécile Huin-Schohn, Nathan Guéguinou, Eric Tschirhart, and Jean-Pol Frippiat. 2009. "Spaceflight-Associated Changes in Immunoglobulin VH Gene Expression in the Amphibian Pleurodeles Waltl." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of*

American Societies for Experimental Biology 23 (5): 1607–15. https://doi.org/10.1096/fj.08-121327.

Bassing, C. H., F. W. Alt, M. M. Hughes, M. D'Auteuil, T. D. Wehrly, B. B. Woodman, F. Gärtner, J. M. White, L. Davidson, and B. P. Sleckman. 2000. "Recombination Signal Sequences Restrict Chromosomal V(D)J Recombination beyond the 12/23 Rule." *Nature* 405 (6786): 583–86. https://doi.org/10.1038/35014635.

Bassing, Craig H., Wojciech Swat, and Frederick W. Alt. 2002. "The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination." *Cell* 109 Suppl (April): S45-55.

Basso, N., C.G. Bellows, and J.N.M. Heersche. 2005. "Effect of Simulated Weightlessness on Osteoprogenitor Cell Number and Proliferation in Young and Adult Rats." *Bone* 36 (1): 173–83. https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.09.016.

Batuman, O. A., D. Sajewski, J. E. Ottenweller, D. L. Pitman, and B. H. Natelson. 1990. "Effects of Repeated Stress on T Cell Numbers and Function in Rats." *Brain, Behavior, and Immunity* 4 (2): 105–17.

Bauer, Moisés E., Cristina M. Moriguchi Jeckel, and Clarice Luz. 2009. "The Role of Stress Factors during Aging of the Immune System." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1153 (1): 139–52. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03966.x.

Bauer, Moisés E., Guilherme C. Muller, Bruna Luz Correa, Priscila Vianna, James E. Turner, and Jos A. Bosch. 2013. "Psychoneuroendocrine Interventions Aimed at Attenuating Immunosenescence: A Review." *Biogerontology* 14 (1): 9–20. https://doi.org/10.1007/s10522-012-9412-5.

Beerman, I., D. Bhattacharya, S. Zandi, M. Sigvardsson, I. L. Weissman, D. Bryder, and D. J. Rossi. 2010. "Functionally Distinct Hematopoietic Stem Cells Modulate Hematopoietic Lineage Potential during Aging by a Mechanism of Clonal Expansion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (12): 5465–70. https://doi.org/10.1073/pnas.1000834107.

Beijers, Roseriet, Jarno Jansen, Marianne Riksen-Walraven, and Carolina de Weerth. 2010. "Maternal Prenatal Anxiety and Stress Predict Infant Illnesses and Health Complaints." *Pediatrics* 126 (2): e401-409. https://doi.org/10.1542/peds.2009-3226.

Belay, Tesfaye, Hernan Aviles, Monique Vance, Kimberly Fountain, and Gerald Sonnenfeld. 2002. "Effects of the Hindlimb-Unloading Model of Spaceflight Conditions on Resistance of Mice to Infection with Klebsiella Pneumoniae." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110 (2): 262–68.

Benedict, C. L., S. Gilfillan, T. H. Thai, and J. F. Kearney. 2000. "Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Repertoire Development." *Immunological Reviews* 175 (June): 150–57.

Benjamin, Cara L., Raymond P. Stowe, Lisa St John, Clarence F. Sams, Satish K. Mehta, Brian E. Crucian, Duane L. Pierson, and Krishna V. Komanduri. 2016. "Decreases in Thymopoiesis of Astronauts Returning from Space Flight." *JCI Insight* 1 (12): e88787. https://doi.org/10.1172/jci.insight.88787.

Bereshchenko, Oxana, Stefano Bruscoli, and Carlo Riccardi. 2018. "Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity." *Frontiers in Immunology* 9: 1332. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01332.

Bernard, Claude. 1865. *Introduction à l'étude de La Médecine Expérimentale*. Garnier-Flammarion, 1966.

Berrih-Aknin, Sonia, and Bruno Eymard. 1999. "Thymus et Pathologies," Medecine Thérapeutique, 5 (7): 579–86.

Bertolino, Eric, Karen Reddy, Kay L Medina, Evan Parganas, James Ihle, and Harinder Singh. 2005. "Regulation of Interleukin 7–Dependent Immunoglobulin Heavy-Chain Variable Gene Rearrangements by Transcription Factor STAT5." *Nature Immunology* 6 (8): 836–43. https://doi.org/10.1038/ni1226.

Berzofsky, J. A., S. J. Brett, H. Z. Streicher, and H. Takahashi. 1988. "Antigen Processing for Presentation to T Lymphocytes: Function, Mechanisms, and Implications for the T-Cell Repertoire." *Immunological Reviews* 106 (December): 5–31.

Bevington, Sarah, and Joan Boyes. 2013. “Transcription-Coupled Eviction of Histones H2A/H2B Governs V(D)J Recombination.” *The EMBO Journal* 32 (10): 1381–92. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.42.

Boehmer, H. von, and H. J. Fehling. 1997. “Structure and Function of the Pre-T Cell Receptor.” *Annual Review of Immunology* 15: 433–52. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.433.

Boehmer, Harald von. 2005. “Opinion: Unique Features of the Pre-T-Cell Receptor α-Chain: Not Just a Surrogate.” *Nature Reviews Immunology* 5 (7): 571–77. https://doi.org/10.1038/nri1636.

Boonyaratanakornkit, J. B., A. Cogoli, C.-F. Li, T. Schopper, P. Pippia, G. Galleri, M. A. Meloni, and M. Hughes-Fulford. 2005. “Key Gravity-Sensitive Signaling Pathways Drive T Cell Activation.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (14): 2020–22. https://doi.org/10.1096/fj.05-3778fje.

Bossen, Claudia, Robert Mansson, and Cornelis Murre. 2012. “Chromatin Topology and the Regulation of Antigen Receptor Assembly.” *Annual Review of Immunology* 30: 337–56. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075003.

Boxio, Rachel, Christian Dournon, and Jean-Pol Frippiat. 2005. “Effects of a Long-Term Spaceflight on Immunoglobulin Heavy Chains of the Urodele Amphibian Pleurodeles Waltl.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 98 (3): 905–10. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00957.2004.

Boyman, Onur, Sven Létourneau, Carsten Krieg, and Jonathan Sprent. 2009. “Homeostatic Proliferation and Survival of Naïve and Memory T Cells.” *European Journal of Immunology* 39 (8): 2088–94. https://doi.org/10.1002/eji.200939444.

Bradl, H., J. Wittmann, D. Milius, C. Vettermann, and H.-M. Jack. 2003. “Interaction of Murine Precursor B Cell Receptor with Stroma Cells Is Controlled by the Unique Tail of 5 and Stroma Cell-Associated Heparan Sulfate.” *The Journal of Immunology* 171 (5): 2338–48. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2338.

Brady, B. L., N. C. Steinel, and C. H. Bassing. 2010. “Antigen Receptor Allelic Exclusion: An Update and Reappraisal.” *The Journal of Immunology* 185 (7): 3801–8. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001158.

Brandsma, Inger, and Dik C Gent. 2012. “Pathway Choice in DNA Double Strand Break Repair: Observations of a Balancing Act.” *Genome Integrity* 3 (1): 9. https://doi.org/10.1186/2041-9414-3-9.

Braunstein, Marsela, and Michele K. Anderson. 2012. “HEB in the Spotlight: Transcriptional Regulation of T-Cell Specification, Commitment, and Developmental Plasticity.” *Clinical and Developmental Immunology* 2012: 1–15. https://doi.org/10.1155/2012/678705.

Burg, M. van der, B. H. Barendregt, T. Szczepañski, E. R. van Wering, A. W. Langerak, and J. J. M. van Dongen. 2002. “Immunoglobulin Light Chain Gene Rearrangements Display Hierarchy in Absence of Selection for Functionality in Precursor-B-ALL.” *Leukemia* 16 (8): 1448–53. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402548.

Burg, Mirjam van der, Nicole S. Verkaik, Alexander T. den Dekker, Barbara H. Barendregt, Ingrid Pico-Knijnenburg, Ilhan Tezcan, Jacques J. M. vanDongen, and Dik C. van Gent. 2007. “Defective Artemis Nuclease Is Characterized by Coding Joints with Microhomology in Long Palindromic-Nucleotide Stretches.” *European Journal of Immunology* 37 (12): 3522–28. https://doi.org/10.1002/eji.200737624.

Burns, Victoria E., Douglas Carroll, Christopher Ring, and Mark Drayson. 2003. “Antibody Response to Vaccination and Psychosocial Stress in Humans: Relationships and Mechanisms.” *Vaccine* 21 (19–20): 2523–34.

Burnstein, Kerry L., Deborah L. Bellingham, Christine M. Jewell, Frances E. Powell-Oliver, and John A. Cidlowski. 1991. “Autoregulation of Glucocorticoid Receptor Gene Expression.” *Steroids* 56 (2): 52–58. https://doi.org/10.1016/0039-128X(91)90124-E.

Cabahug-Zuckerman, Pamela, Dorra Frikha-Benayed, Robert J. Majeska, Alyssa Tuthill, Shoshana Yakar, Stefan Judex, and Mitchell B. Schaffler. 2016. “Osteocyte Apoptosis Caused by Hindlimb Unloading Is Required to Trigger Osteocyte RANKL Production and Subsequent

Resorption of Cortical and Trabecular Bone in Mice Femurs." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 31 (7): 1356–65. https://doi.org/10.1002/jbmr.2807.

Cabaniols, J. P., N. Fazilleau, A. Casrouge, P. Kourilsky, and J. M. Kanellopoulos. 2001. "Most Alpha/Beta T Cell Receptor Diversity Is Due to Terminal Deoxynucleotidyl Transferase." *The Journal of Experimental Medicine* 194 (9): 1385–90.

Cahill, Shawn P., and Kristin Pontoski. 2005. "Post-Traumatic Stress Disorder and Acute Stress Disorder I: Their Nature and Assessment Considerations." *Psychiatry (Edgmont (Pa.: Township))* 2 (4): 14–25.

Cancro, Michael P., Yi Hao, Jean L. Scholz, Richard L. Riley, Daniela Frasca, Deborah K. Dunn-Walters, and Bonnie B. Blomberg. 2009. "B Cells and Aging: Molecules and Mechanisms." *Trends in Immunology* 30 (7): 313–18. https://doi.org/10.1016/j.it.2009.04.005.

Cannon, W.B. 1915. "Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage; An Account of Recent Researches into the Function of Emotional Excitement." *Science* 42 (1089): 696–700. https://doi.org/10.1126/science.42.1089.696-a.

———. 1926. "Physiological Regulation of Normal States: Some Tentative Postulates Concerning Biological Homeostasis." *In: Pettit A, Editor. A Charles Richet: Ses Amis, Ses Collègues, Ses Élèves (in French) Paris: Les Éditions Médicales*, 91.

Capone, M., P. Romagnoli, F. Beermann, H. R. MacDonald, and J. P. van Meerwijk. 2001. "Dissociation of Thymic Positive and Negative Selection in Transgenic Mice Expressing Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Exclusively on Thymic Cortical Epithelial Cells." *Blood* 97 (5): 1336–42.

Caren, L. D., A. D. Mandel, and J. A. Nunes. 1980. "Effect of Simulated Weightlessness on the Immune System in Rats." *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 51 (3): 251–55.

Carlson, L. A., L. Levi, and L. Orö. 1968. "Plasma Lipids and Urinary Excretion of Catecholamines in Man during Experimentally Induced Emotional Stress, and Their Modification by Nicotinic Acid." *The Journal of Clinical Investigation* 47 (8): 1795–1805. https://doi.org/10.1172/JCI105869.

Carpenter, Andrea C., Katherine S. Yang-Iott, Linda H. Chao, Beth Nuskey, Scott Whitlow, Frederick W. Alt, and Craig H. Bassing. 2009. "Assembled DJ Beta Complexes Influence TCR Beta Chain Selection and Peripheral V Beta Repertoire." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (9): 5586–95. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803270.

Carsia, R. V., and S. Malamed. 1983. "Glucocorticoid Control of Steroidogenesis in Isolated Rat Adrenocortical Cells." *Biochimica Et Biophysica Acta* 763 (1): 83–89.

Casanova, J. L., P. Romero, C. Widmann, P. Kourilsky, and J. L. Maryanski. 1991. "T Cell Receptor Genes in a Series of Class I Major Histocompatibility Complex-Restricted Cytotoxic T Lymphocyte Clones Specific for a Plasmodium Berghei Nonapeptide: Implications for T Cell Allelic Exclusion and Antigen-Specific Repertoire." *The Journal of Experimental Medicine* 174 (6): 1371–83.

Chancellor, Jeffery C., Graham B. I. Scott, and Jeffrey P. Sutton. 2014. "Space Radiation: The Number One Risk to Astronaut Health beyond Low Earth Orbit." *Life (Basel, Switzerland)* 4 (3): 491–510. https://doi.org/10.3390/life4030491.

Chang, Tammy T., Isabelle Walther, Chai-Fei Li, Jim Boonyaratanakornkit, Grazia Galleri, Maria Antonia Meloni, Proto Pippia, Augusto Cogoli, and Millie Hughes-Fulford. 2012. "The Rel/NF-KB Pathway and Transcription of Immediate Early Genes in T Cell Activation Are Inhibited by Microgravity." *Journal of Leukocyte Biology* 92 (6): 1133–45. https://doi.org/10.1189/jlb.0312157.

Chapes, S. K., A. M. Mastro, G. Sonnenfeld, and W. D. Berry. 1993. "Antiorthostatic Suspension as a Model for the Effects of Spaceflight on the Immune System." *Journal of Leukocyte Biology* 54 (3): 227–35.

Chapman, Karen, Megan Holmes, and Jonathan Seckl. 2013. “11β-Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action.” *Physiological Reviews* 93 (3): 1139–1206. https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012.

Charlemagne, J. 1987. “Antibody Diversity in Amphibians. Noninbred Axolotls Used the Same Unique Heavy Chain and a Limited Number of Light Chains for Their Anti-2,4-Dinitrophenyl Antibody Responses.” *European Journal of Immunology* 17 (3): 421–24. https://doi.org/10.1002/eji.1830170319.

Chen, Ying, and John Lyga. 2014. “Brain-Skin Connection: Stress, Inflammation and Skin Aging.” *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 13 (3): 177–90. https://doi.org/10.2174/1871528113666140522104422.

Cherrier, Marie. 2014. “Les Cellules Lymphoïdes Innées: De Nouveaux Acteurs de La Réponse Immune Mucosale.” *Médecine/Sciences* 30 (3): 280–88. https://doi.org/10.1051/medsci/20143003016.

Choi, Joungbum, Su Jin Lee, Yun A Lee, Hyung Gun Maeng, Jong Kyun Lee, and Yong Won Kang. 2014. “Reference Values for Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in a Healthy Korean Population.” *Immune Network* 14 (6): 289. https://doi.org/10.4110/in.2014.14.6.289.

Choi, Young I., Jonathan S. Duke-Cohan, Wesam B. Ahmed, Maris A. Handley, Fanny Mann, Jonathan A. Epstein, Linda K. Clayton, and Ellis L. Reinherz. 2008. “PlexinD1 Glycoprotein Controls Migration of Positively Selected Thymocytes into the Medulla.” *Immunity* 29 (6): 888–98. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.10.008.

Chotinantakul, Kamonnaree, and Wilairat Leeanansaksiri. 2012. “Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways.” *Bone Marrow Research* 2012: 270425. https://doi.org/10.1155/2012/270425.

Chung, James B., Michael Silverman, and John G. Monroe. 2003. “Transitional B Cells: Step by Step towards Immune Competence.” *Trends in Immunology* 24 (6): 343–49.

Clark, Marcus R., Malay Mandal, Kyoko Ochiai, and Harinder Singh. 2014. “Orchestrating B Cell Lymphopoiesis through Interplay of IL-7 Receptor and Pre-B Cell Receptor Signalling.” *Nature Reviews Immunology* 14 (2): 69–80. https://doi.org/10.1038/nri3570.

Cobaleda, César, Alexandra Schebesta, Alessio Delogu, and Meinrad Busslinger. 2007. “Pax5: The Guardian of B Cell Identity and Function.” *Nature Immunology* 8 (5): 463–70. https://doi.org/10.1038/ni1454.

Cogoli, A., and A. Tschopp. 1985. “Lymphocyte Reactivity during Spaceflight.” *Immunology Today* 6 (1): 1–4. https://doi.org/10.1016/0167-5699(85)90151-3.

Cogoli-Greuter, M., M. A. Meloni, L. Sciola, A. Spano, P. Pippia, G. Monaco, and A. Cogoli. 1996. “Movements and Interactions of Leukocytes in Microgravity.” *Journal of Biotechnology* 47 (2–3): 279–87.

Conde, C., S. Weller, S. Gilfillan, L. Marcellin, T. Martin, and J. L. Pasquali. 1998. “Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Deficiency Reduces the Incidence of Autoimmune Nephritis in (New Zealand Black x New Zealand White)F1 Mice.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (12): 7023–30.

Cong, Min, Tianhui Liu, Dan Tian, Hongbo Guo, Ping Wang, Kai Liu, Jun Lin, et al. 2016. “Interleukin-2 Enhances the Regulatory Functions of $CD4^+$ T Cell-Derived $CD4^-$ $CD8^-$ Double Negative T Cells.” *Journal of Interferon & Cytokine Research* 36 (8): 499–505. https://doi.org/10.1089/jir.2015.0093.

Cook, G. P., and I. M. Tomlinson. 1995. “The Human Immunoglobulin VH Repertoire.” *Immunology Today* 16 (5): 237–42. https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80166-9.

Cooper, D., and N. R. Pellis. 1998. “Suppressed PHA Activation of T Lymphocytes in Simulated Microgravity Is Restored by Direct Activation of Protein Kinase C.” *Journal of Leukocyte Biology* 63 (5): 550–62.

Cooper, Max D., and Matthew N. Alder. 2006. “The Evolution of Adaptive Immune Systems.” *Cell* 124 (4): 815–22. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001.

Corbett, Brittany, Lisa Weinberg, and Audrey Duarte. 2017. “The Effect of Mild Acute Stress during Memory Consolidation on Emotional Recognition Memory.” *Neurobiology of Learning and Memory* 145 (November): 34–44. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.08.005.

Corfe, Steven A., and Christopher J. Paige. 2012. “The Many Roles of IL-7 in B Cell Development; Mediator of Survival, Proliferation and Differentiation.” *Seminars in Immunology* 24 (3): 198–208. https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.02.001.

Corthay, A. 2009. “How Do Regulatory T Cells Work?” *Scandinavian Journal of Immunology* 70 (4): 326–36. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x.

Crabbé, Aurélie, Michael J. Schurr, Pieter Monsieurs, Lisa Morici, Jill Schurr, James W. Wilson, C. Mark Ott, et al. 2011. “Transcriptional and Proteomic Responses of *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1 to Spaceflight Conditions Involve Hfq Regulation and Reveal a Role for Oxygen.” *Applied and Environmental Microbiology* 77 (4): 1221–30. https://doi.org/10.1128/AEM.01582-10.

Critchlow, S. E., R. P. Bowater, and S. P. Jackson. 1997. “Mammalian DNA Double-Strand Break Repair Protein XRCC4 Interacts with DNA Ligase IV.” *Current Biology: CB* 7 (8): 588–98.

Crotty, Shane, Phil Felgner, Huw Davies, John Glidewell, Luis Villarreal, and Rafi Ahmed. 2003. “Cutting Edge: Long-Term B Cell Memory in Humans after Smallpox Vaccination.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (10): 4969–73.

Crucian, B. E., M. L. Cubbage, and C. F. Sams. 2000. “Altered Cytokine Production by Specific Human Peripheral Blood Cell Subsets Immediately Following Space Flight.” *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 20 (6): 547–56. https://doi.org/10.1089/10799900050044741.

Crucian, Brian, Adriana Babiak-Vazquez, Smith Johnston, Duane L. Pierson, C. Mark Ott, and Clarence Sams. 2016. “Incidence of Clinical Symptoms during Long-Duration Orbital Spaceflight.” *International Journal of General Medicine* 9: 383–91. https://doi.org/10.2147/IJGM.S114188.

Crucian, Brian E., Raymond P. Stowe, Duane L. Pierson, and Clarence F. Sams. 2008. “Immune System Dysregulation Following Short- vs Long-Duration Spaceflight.” *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 79 (9): 835–43.

Crucian, Brian E., Sara R. Zwart, Satish Mehta, Peter Uchakin, Heather D. Quiriarte, Duane Pierson, Clarence F. Sams, and Scott M. Smith. 2014. “Plasma Cytokine Concentrations Indicate That *In Vivo* Hormonal Regulation of Immunity Is Altered During Long-Duration Spaceflight.” *Journal of Interferon & Cytokine Research* 34 (10): 778–86. https://doi.org/10.1089/jir.2013.0129.

Cubano, Luis A, and Marian L Lewis. 2000. “Fas/APO-1 Protein Is Increased in Spaceflown Lymphocytes (Jurkat)☆.” *Experimental Gerontology* 35 (3): 389–400. https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00090-5.

Dalal, Ilan, and Tasher. 2012. “The Genetic Basis of Severe Combined Immunodeficiency and Its Variants.” *The Application of Clinical Genetics*, August, 67. https://doi.org/10.2147/TACG.S18693.

Das, Arundhoti, Christelle Harly, Qi Yang, and Avinash Bhandoola. 2018. “Lineage Specification in Innate Lymphocytes.” *Cytokine & Growth Factor Reviews* 42: 20–26. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.01.005.

Dash, Pradyot, Andrew J. Fiore-Gartland, Tomer Hertz, George C. Wang, Shalini Sharma, Aisha Souquette, Jeremy Chase Crawford, et al. 2017. “Quantifiable Predictive Features Define Epitope-Specific T Cell Receptor Repertoires.” *Nature* 547 (7661): 89–93. https://doi.org/10.1038/nature22383.

Datson, Nicole A., Maarten C. Morsink, Onno C. Meijer, and E. Ronald de Kloet. 2008. “Central Corticosteroid Actions: Search for Gene Targets.” *European Journal of Pharmacology* 583 (2–3): 272–89. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.070.

Davis, Mark M., and Pamela J. Bjorkman. 1988. “T-Cell Antigen Receptor Genes and T-Cell Recognition.” *Nature* 334 (6181): 395–402. https://doi.org/10.1038/334395a0.

De Boer, S.F., S.J. Koopmans, J.L. Slangen, and J. Van Der Gugten. 1990. “Plasma Catecholamine, Corticosterone and Glucose Responses to Repeated Stress in Rats: Effect of Interstressor Interval Length.” *Physiology & Behavior* 47 (6): 1117–24. https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90361-7.

De Kloet, E. R., E. Vreugdenhil, M. S. Oitzl, and M. Joëls. 1998. “Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease.” *Endocrine Reviews* 19 (3): 269–301. https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0331.

Deftos, M. L., and M. J. Bevan. 2000. “Notch Signaling in T Cell Development.” *Current Opinion in Immunology* 12 (2): 166–72.

DeKoter, R. P., and H. Singh. 2000. “Regulation of B Lymphocyte and Macrophage Development by Graded Expression of PU.1.” *Science (New York, N.Y.)* 288 (5470): 1439–41.

Delp, Michael D., Jacqueline M. Charvat, Charles L. Limoli, Ruth K. Globus, and Payal Ghosh. 2016. “Apollo Lunar Astronauts Show Higher Cardiovascular Disease Mortality: Possible Deep Space Radiation Effects on the Vascular Endothelium.” *Scientific Reports* 6: 29901. https://doi.org/10.1038/srep29901.

Deo, Sudha S., Kejal J. Mistry, Amol M. Kakade, and Pramod V. Niphadkar. 2010. “Role Played by Th2 Type Cytokines in IgE Mediated Allergy and Asthma.” *Lung India: Official Organ of Indian Chest Society* 27 (2): 66–71. https://doi.org/10.4103/0970-2113.63609.

Dhabhar, F. S., and B. S. McEwen. 1996. “Stress-Induced Enhancement of Antigen-Specific Cell-Mediated Immunity.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 156 (7): 2608–15.

———. 1997. “Acute Stress Enhances While Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity in Vivo: A Potential Role for Leukocyte Trafficking.” *Brain, Behavior, and Immunity* 11 (4): 286–306. https://doi.org/10.1006/brbi.1997.0508.

Dhabhar, Firdaus S. 2009. “Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology.” *Neuroimmunomodulation* 16 (5): 300–317. https://doi.org/10.1159/000216188.

Dhabhar, Firdaus S., William B. Malarkey, Eric Neri, and Bruce S. McEwen. 2012. “Stress-Induced Redistribution of Immune Cells--from Barracks to Boulevards to Battlefields: A Tale of Three Hormones--Curt Richter Award Winner.” *Psychoneuroendocrinology* 37 (9): 1345–68. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.05.008.

Dhabhar, Firdaus S., and Kavitha Viswanathan. 2005. “Short-Term Stress Experienced at Time of Immunization Induces a Long-Lasting Increase in Immunologic Memory.” *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289 (3): R738-744. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00145.2005.

Dijk-Härd, I. van, I. Söderström, S. Feld, D. Holmberg, and I. Lundkvist. 1997. “Age-Related Impaired Affinity Maturation and Differential D-JH Gene Usage in Human VH6-Expressing B Lymphocytes from Healthy Individuals.” *European Journal of Immunology* 27 (6): 1381–86. https://doi.org/10.1002/eji.1830270613.

Dirks, Marlou L., Benjamin T. Wall, Bas van de Valk, Tanya M. Holloway, Graham P. Holloway, Adrian Chabowski, Gijs H. Goossens, and Luc J.C. van Loon. 2016. “One Week of Bed Rest Leads to Substantial Muscle Atrophy and Induces Whole-Body Insulin Resistance in the Absence of Skeletal Muscle Lipid Accumulation.” *Diabetes* 65 (10): 2862–75. https://doi.org/10.2337/db15-1661.

Diz-Chaves, Yolanda, Mariana Astiz, Maria José Bellini, and Luis M. Garcia-Segura. 2013. “Prenatal Stress Increases the Expression of Proinflammatory Cytokines and Exacerbates the Inflammatory Response to LPS in the Hippocampal Formation of Adult Male Mice.” *Brain, Behavior, and Immunity* 28 (February): 196–206. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.11.013.

Dogan, Ismail, Barbara Bertocci, Valérie Vilmont, Frédéric Delbos, Jérome Mégret, Sébastien Storck, Claude-Agnès Reynaud, and Jean-Claude Weill. 2009. “Multiple Layers of B Cell Memory with Different Effector Functions.” *Nature Immunology* 10 (12): 1292–99. https://doi.org/10.1038/ni.1814.

Domínguez-Gerpe, L., and M. Rey-Méndez. 2001. “Alterations Induced by Chronic Stress in Lymphocyte Subsets of Blood and Primary and Secondary Immune Organs of Mice.” *BMC Immunology* 2: 7.

Donaldson, Charles L., Stephen B. Hulley, John M. Vogel, Robert S. Hattner, Jon H. Bayers, and Donald E. McMillan. 1970. “Effect of Prolonged Bed Rest on Bone Mineral.” *Metabolism* 19 (12): 1071–84. https://doi.org/10.1016/0026-0495(70)90032-6.

Dong, Mengqi, Patricio Artusa, Stephanie A. Kelly, Marilaine Fournier, Troy A. Baldwin, Judith N. Mandl, and Heather J. Melichar. 2017. “Alterations in the Thymic Selection Threshold Skew the Self-Reactivity of the TCR Repertoire in Neonates.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, June. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602137.

Douziech, Nadine, Ildikò Seres, Anis Larbi, Edit Szikszay, Pierre Michel Roy, Marcel Arcand, Gilles Dupuis, and Tamàs Fulop. 2002. “Modulation of Human Lymphocyte Proliferative Response with Aging.” *Experimental Gerontology* 37 (2–3): 369–87.

Du Pasquier, L., J. Robert, M. Courtet, and R. Mussmann. 2000. “B-Cell Development in the Amphibian Xenopus.” *Immunological Reviews* 175 (June): 201–13.

Dunn-Walters, D. K. 2016. “The Ageing Human B Cell Repertoire: A Failure of Selection?” *Clinical and Experimental Immunology* 183 (1): 50–56. https://doi.org/10.1111/cei.12700.

Dutta, Sulagna, and Pallav Sengupta. 2016. “Men and Mice: Relating Their Ages.” *Life Sciences* 152 (May): 244–48. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025.

Dylke, Janis, Jared Lopes, May Dang-Lawson, Steve Machtaler, and Linda Matsuuchi. 2007. “Role of the Extracellular and Transmembrane Domain of Ig-Alpha/Beta in Assembly of the B Cell Antigen Receptor (BCR).” *Immunology Letters* 112 (1): 47–57. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.06.005.

Fantuzzi, G., and P. Ghezzi. 1993. “Glucocorticoids as Cytokine Inhibitors: Role in Neuroendocrine Control and Therapy of Inflammatory Diseases.” *Mediators of Inflammation* 2 (4): 263–70. https://doi.org/10.1155/S0962935193000365.

Fehling, H. J., B. M. Iritani, A. Krotkova, K. A. Forbush, C. Laplace, R. M. Perlmutter, and H. von Boehmer. 1997. “Restoration of Thymopoiesis in PT Alpha-/- Mice by Anti-CD3epsilon Antibody Treatment or with Transgenes Encoding Activated Lck or Tailless PT Alpha.” *Immunity* 6 (6): 703–14.

Fehling, Hans Jörg, Anna Krotkova, Claude Saint-Ruf, and Harald von Boehmer. 1995. “Crucial Role of the Pre-T-Cell Receptor α Gene in Development of Ap but Not Γδ T Cells.” *Nature* 375 (6534): 795–98. https://doi.org/10.1038/375795a0.

Fellah, J. S., S. Iscaki, J. P. Vaerman, and J. Charlemagne. 1992. “Transient Developmental Expression of IgY and Secretory Component like Protein in the Gut of the Axolotl (Ambystoma Mexicanum).” *Developmental Immunology* 2 (3): 181–90.

Fellah, J. S., C. Jacques, and J. Charlemagne. 1994. “Characterization of Immunoglobulin Heavy Chain Variable Regions in the Mexican Axolotl.” *Immunogenetics* 39 (3): 201–6.

Fellah, J. S., F. Kerfourn, and J. Charlemagne. 1994. “Evolution of T Cell Receptor Genes. Extensive Diversity of V Beta Families in the Mexican Axolotl.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 153 (10): 4539–45.

Felten, D.L. 1993. “Direct Innervation of Lymphoid Organs: Substrate for Neurotransmitter Signaling of Cells of the Immune System.” *Neuropsychobiology* 28 (1–2): 110–12. https://doi.org/10.1159/000119011.

Finnish-German APECED Consortium. 1997. “An Autoimmune Disease, APECED, Caused by Mutations in a Novel Gene Featuring Two PHD-Type Zinc-Finger Domains.” *Nature Genetics* 17 (4): 399–403. https://doi.org/10.1038/ng1297-399.

Finsterwald, Charles, and Cristina M. Alberini. 2014. “Stress and Glucocorticoid Receptor-Dependent Mechanisms in Long-Term Memory: From Adaptive Responses to Psychopathologies.” *Neurobiology of Learning and Memory* 112 (July): 17–29. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.09.017.

Fitzgerald, Peter, Sinead M. O'Brien, Paul Scully, Kim Rijkers, Lucinda V. Scott, and Timothy G. Dinan. 2005. "Cutaneous Glucocorticoid Receptor Sensitivity and Pro-Inflammatory Cytokine Levels in Antidepressant-Resistant Depression." *Psychological Medicine* 36 (01): 37. https://doi.org/10.1017/S003329170500632X.

Flajnik, Martin F., and Masanori Kasahara. 2010. "Origin and Evolution of the Adaptive Immune System: Genetic Events and Selective Pressures." *Nature Reviews. Genetics* 11 (1): 47–59. https://doi.org/10.1038/nrg2703.

Fleming, S. D., C. F. Rosenkrans, and S. K. Chapes. 1990. "Test of the Antiorthostatic Suspension Model on Mice: Effects on the Inflammatory Cell Response." *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 61 (4): 327–32.

Fletcher, Daniel A., and R. Dyche Mullins. 2010. "Cell Mechanics and the Cytoskeleton." *Nature* 463 (7280): 485–92. https://doi.org/10.1038/nature08908.

Flint, Melanie S., Raluca A. Budiu, Pang-ning Teng, Mai Sun, Donna B. Stolz, Megan Lang, Brian L. Hood, Anda M. Vlad, and Thomas P. Conrads. 2011. "Restraint Stress and Stress Hormones Significantly Impact T Lymphocyte Migration and Function through Specific Alterations of the Actin Cytoskeleton." *Brain, Behavior, and Immunity* 25 (6): 1187–96. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.009.

Föger, N., R. Marhaba, and M. Zöller. 2000. "CD44 Supports T Cell Proliferation and Apoptosis by Apposition of Protein Kinases." *European Journal of Immunology* 30 (10): 2888–99. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200010)30:10<2888::AID-IMMU2888>3.0.CO;2-4.

Fontaine-Perus, J. C., F. M. Calman, C. Kaplan, and N. M. Le Douarin. 1981. "Seeding of the 10-Day Mouse Embryo Thymic Rudiment by Lymphocyte Precursors in Vitro." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 126 (6): 2310–16.

Fonte, Coralie, Arnaud Gruez, Stéphanie Ghislin, and Jean-Pol Frippiat. 2015. "The Urodele Amphibian Pleurodeles Waltl Has a Diverse Repertoire of Immunoglobulin Heavy Chains with Polyreactive and Species-Specific Features." *Developmental & Comparative Immunology* 53 (2): 371–84. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.08.006.

Frasca, Daniela, and Bonnie B. Blomberg. 2009. "Effects of Aging on B Cell Function." *Current Opinion in Immunology* 21 (4): 425–30. https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.06.001.

Freeman, J. D., R. L. Warren, J. R. Webb, B. H. Nelson, and R. A. Holt. 2009. "Profiling the T-Cell Receptor Beta-Chain Repertoire by Massively Parallel Sequencing." *Genome Research* 19 (10): 1817–24. https://doi.org/10.1101/gr.092924.109.

Frippiat, Jean-Pol. 2013. "Contribution of the Urodele Amphibian Pleurodeles Waltl to the Analysis of Spaceflight-Associated Immune System Deregulation." *Molecular Immunology* 56 (4): 434–41. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.06.011.

Frippiat, Jean-Pol, Brian E Crucian, Dominique J-F de Quervain, Daniela Grimm, Nicola Montano, Siegfried Praun, Benno Roozendaal, et al. 2016. "Towards Human Exploration of Space: The THESEUS Review Series on Immunology Research Priorities." *Npj Microgravity* 2 (1). https://doi.org/10.1038/npjmgrav.2016.40.

Frippiat, Jean-Pol, Christophe Frippiat, Pascaline Kremarik, Armelle Ropars, and Christian Dournon. 2001. "The Recombination-Activating Gene 1 of Pleurodeles Waltl (Urodele Amphibian) Is Transcribed in Lymphoid Tissues and in the Central Nervous System." *Immunogenetics* 52 (3–4): 264–75. https://doi.org/10.1007/s002510000275.

Fulcher, D. A., and A. Basten. 1997. "B Cell Life Span: A Review." *Immunology and Cell Biology* 75 (5): 446–55. https://doi.org/10.1038/icb.1997.69.

Füllgrabe, J, N Hajji, and B Joseph. 2010. "Cracking the Death Code: Apoptosis-Related Histone Modifications." *Cell Death & Differentiation* 17 (8): 1238–43. https://doi.org/10.1038/cdd.2010.58.

Fulop, Tamas, Anis Larbi, Nadine Douziech, Carl Fortin, Kal-Philippe Guérard, Olivier Lesur, Abdelouahed Khalil, and Gilles Dupuis. 2004. "Signal Transduction and Functional Changes in

Neutrophils with Aging: Neutrophil Function and Aging, T. Fulop et Al." *Aging Cell* 3 (4): 217–26. https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00110.x.

Fuxa, Martin, Jane Skok, Abdallah Souabni, Giorgia Salvagiotto, Esther Roldan, and Meinrad Busslinger. 2004. "Pax5 Induces V-to-DJ Rearrangements and Locus Contraction of the Immunoglobulin Heavy-Chain Gene." *Genes & Development* 18 (4): 411–22. https://doi.org/10.1101/gad.291504.

Gaignier, Fanny, Christine Legrand-Frossi, Emilien Stragier, Julianne Mathiot, Jean-Louis Merlin, Charles Cohen-Salmon, Laurence Lanfumey, and Jean-Pol Frippiat. 2018. "A Model of Chronic Exposure to Unpredictable Mild Socio-Environmental Stressors Replicates Some Spaceflight-Induced Immunological Changes." *Frontiers in Physiology* 9 (May). https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00514.

Gaignier, Fanny, Véronique Schenten, Marcelo De Carvalho Bittencourt, Guillemette Gauquelin-Koch, Jean-Pol Frippiat, and Christine Legrand-Frossi. 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." Edited by Jason R. Lees. *PLoS ONE* 9 (3): e92664. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092664.

Galimberti, Massimo, Iva M. Tolić-Nørrelykke, Roberto Favillini, Raffaella Mercatelli, Francesco Annunziato, Lorenzo Cosmi, Francesco Liotta, Veronica Santarlasci, Enrico Maggi, and Francesco S. Pavone. 2006. "Hypergravity Speeds up the Development of T-Lymphocyte Motility." *European Biophysics Journal* 35 (5): 393–400. https://doi.org/10.1007/s00249-006-0046-x.

Gao, George F., Zihe Rao, and John I. Bell. 2002. "Molecular Coordination of Alphabeta T-Cell Receptors and Coreceptors CD8 and CD4 in Their Recognition of Peptide-MHC Ligands." *Trends in Immunology* 23 (8): 408–13.

Garrido, Pedro, Marta de Blas, Alberto Del Arco, Gregorio Segovia, and Francisco Mora. 2012. "Aging Increases Basal but Not Stress-Induced Levels of Corticosterone in the Brain of the Awake Rat." *Neurobiology of Aging* 33 (2): 375–82. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.015.

Garvy, B. A., and P. J. Fraker. 1991. "Suppression of the Antigenic Response of Murine Bone Marrow B Cells by Physiological Concentrations of Glucocorticoids." *Immunology* 74 (3): 519–23.

Garvy, B. A., L. E. King, W. G. Telford, L. A. Morford, and P. J. Fraker. 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 (4): 587–92.

Gauthier, Laurent, Benjamin Rossi, Florence Roux, Elise Termine, and Claudine Schiff. 2002. "Galectin-1 Is a Stromal Cell Ligand of the Pre-B Cell Receptor (BCR) Implicated in Synapse Formation between Pre-B and Stromal Cells and in Pre-BCR Triggering." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (20): 13014–19. https://doi.org/10.1073/pnas.202323999.

Gavazzi, Gaëtan, and Karl-Heinz Krause. 2002. "Ageing and Infection." *The Lancet. Infectious Diseases* 2 (11): 659–66.

Gebert, Claudia, Lauren Correia, Zhenhu Li, Howard T. Petrie, Paul E. Love, and Karl Pfeifer. 2017. "Chromosome Choice for Initiation of V-(D)-J Recombination Is Not Governed by Genomic Imprinting." *Immunology and Cell Biology* 95 (5): 473–77. https://doi.org/10.1038/icb.2017.1.

Geisberger, Roland, Marinus Lamers, and Gernot Achatz. 2006. "The Riddle of the Dual Expression of IgM and IgD." *Immunology* 0 (0): 060526021554006-??? https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02386.x.

Geissmann, Frederic, Markus G. Manz, Steffen Jung, Michael H. Sieweke, Miriam Merad, and Klaus Ley. 2010. "Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells." *Science (New York, N.Y.)* 327 (5966): 656–61. https://doi.org/10.1126/science.1178331.

Ghislin, Stéphanie, Nassima Ouzren-Zarhloul, Sandra Kaminski, and Jean-Pol Frippiat. 2015. "Hypergravity Exposure during Gestation Modifies the TCRβ Repertoire of Newborn Mice." *Scientific Reports* 5 (1). https://doi.org/10.1038/srep09318.

Giudicelli, V. 2004. "IMGT/GENE-DB: A Comprehensive Database for Human and Mouse Immunoglobulin and T Cell Receptor Genes." *Nucleic Acids Research* 33 (Database issue): D256–61. https://doi.org/10.1093/nar/gki010.

Glaser, R., J. Sheridan, W. B. Malarkey, R. C. MacCallum, and J. K. Kiecolt-Glaser. 2000. "Chronic Stress Modulates the Immune Response to a Pneumococcal Pneumonia Vaccine." *Psychosomatic Medicine* 62 (6): 804–7.

Glaser, Ronald, and Janice K. Kiecolt-Glaser. 2005. "Science and Society: Stress-Induced Immune Dysfunction: Implications for Health." *Nature Reviews Immunology* 5 (3): 243–51. https://doi.org/10.1038/nri1571.

Globus, Ruth K., and Emily Morey-Holton. 2016. "Hindlimb Unloading: Rodent Analog for Microgravity." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 120 (10): 1196–1206. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00997.2015.

Godbout, Jonathan P., and Ronald Glaser. 2006. "Stress-Induced Immune Dysregulation: Implications for Wound Healing, Infectious Disease and Cancer." *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 1 (4): 421–27. https://doi.org/10.1007/s11481-006-9036-0.

Goldstein, David S. 1987. "Stress-Induced Activation of the Sympathetic Nervous System." *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1 (2): 253–78. https://doi.org/10.1016/S0950-351X(87)80063-0.

Golub, R., and J. Charlemagne. 1998. "Structure, Diversity, and Repertoire of VH Families in the Mexican Axolotl." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160 (3): 1233–39.

Golub, R., J. S. Fellah, and J. Charlemagne. 1997. "Structure and Diversity of the Heavy Chain VDJ Junctions in the Developing Mexican Axolotl." *Immunogenetics* 46 (5): 402–9.

González-García, Sara, Marina García-Peydró, Enrique Martín-Gayo, Esteban Ballestar, Manel Esteller, Rafael Bornstein, José Luis de la Pompa, Adolfo A. Ferrando, and María L. Toribio. 2009. "CSL-MAML-Dependent Notch1 Signaling Controls T Lineage-Specific IL-7R{alpha} Gene Expression in Early Human Thymopoiesis and Leukemia." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (4): 779–91. https://doi.org/10.1084/jem.20081922.

Goodarzi, Aaron A, Yaping Yu, Enriqueta Riballo, Pauline Douglas, Sarah A Walker, Ruiqiong Ye, Christine Härer, et al. 2006. "DNA-PK Autophosphorylation Facilitates Artemis Endonuclease Activity." *The EMBO Journal* 25 (16): 3880–89. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601255.

Goodnow, C. C., J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Wotherspoon, R. H. Loblay, and K. Raphael. 1988. "Altered Immunoglobulin Expression and Functional Silencing of Self-Reactive B Lymphocytes in Transgenic Mice." *Nature* 334 (6184): 676–82. https://doi.org/10.1038/334676a0.

Götz, Alexander A., Sabrina Wittlinger, and Volker Stefanski. 2007. "Maternal Social Stress during Pregnancy Alters Immune Function and Immune Cell Numbers in Adult Male Long-Evans Rat Offspring during Stressful Life-Events." *Journal of Neuroimmunology* 185 (1–2): 95–102. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.01.019.

Gratiot-Deans, J., R. Merino, G. Nuñez, and L. A. Turka. 1994. "Bcl-2 Expression during T-Cell Development: Early Loss and Late Return Occur at Specific Stages of Commitment to Differentiation and Survival." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (22): 10685–89.

Gridley, Daila S., James M. Slater, Xian Luo-Owen, Asma Rizvi, Stephen K. Chapes, Louis S. Stodieck, Virginia L. Ferguson, and Michael J. Pecaut. 2009. "Spaceflight Effects on T Lymphocyte Distribution, Function and Gene Expression." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 106 (1): 194–202. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.91126.2008.

Griffin, Daniel O., Nichol E. Holodick, and Thomas L. Rothstein. 2011. "Human B1 Cells in Umbilical Cord and Adult Peripheral Blood Express the Novel Phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-."

The Journal of Experimental Medicine 208 (1): 67–80. https://doi.org/10.1084/jem.20101499.

Grove, Deborah S., Sharon A. Pishak, and Andrea M. Mastro. 1995. "The Effect of a 10-Day Space Flight on the Function, Phenotype, and Adhesion Molecule Expression of Splenocytes and Lymph Node Lymphocytes." *Experimental Cell Research* 219 (1): 102–9. https://doi.org/10.1006/excr.1995.1210.

Gruver-Yates, Amanda L., Matthew A. Quinn, and John A. Cidlowski. 2014. "Analysis of Glucocorticoid Receptors and Their Apoptotic Response to Dexamethasone in Male Murine B Cells During Development." *Endocrinology* 155 (2): 463–74. https://doi.org/10.1210/en.2013-1473.

Grzywacz, Bartosz, Jeffery S. Miller, and Michael R. Verneris. 2010. "Developmental Stages and Pathways of NK Cell Maturation." In *Natural Killer Cells*, 3–24. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370454-2.00001-6.

Guan, Su-zhen, Ji-wen Liu, Evandro Fei Fang, Tzi Bun Ng, Yu-long Lian, and Hua Ge. 2014. "Chronic Unpredictable Mild Stress Impairs Erythrocyte Immune Function and Changes T-Lymphocyte Subsets in a Rat Model of Stress-Induced Depression." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37 (1): 414–22. https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.12.013.

Guéguinou, Nathan, Mickaël Bojados, Marc Jamon, Hanane Derradji, Sarah Baatout, Eric Tschirhart, Jean-Pol Frippiat, and Christine Legrand-Frossi. 2012. "Stress Response and Humoral Immune System Alterations Related to Chronic Hypergravity in Mice." *Psychoneuroendocrinology* 37 (1): 137–47. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.05.015.

Guéguinou, Nathan, Cécile Huin-Schohn, Matthieu Bascove, Jean-Luc Bueb, Eric Tschirhart, Christine Legrand-Frossi, and Jean-Pol Frippiat. 2009. "Could Spaceflight-Associated Immune System Weakening Preclude the Expansion of Human Presence beyond Earth's Orbit?" *Journal of Leukocyte Biology* 86 (5): 1027–38. https://doi.org/10.1189/jlb.0309167.

Güell, Antonio. 1995. "Lower Body Negative Pressure (LBNP) as a Countermeasure for Long Term Spaceflight." *Acta Astronautica* 35 (4–5): 271–80. https://doi.org/10.1016/0094-5765(95)98732-O.

Gui, Jingang, Lisa Maria Mustachio, Dong-Ming Su, and Ruth W. Craig. 2012. "Thymus Size and Age-Related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma." *Aging and Disease* 3 (3): 280–90.

Guo, Hong, Theresa Barberi, Rahul Suresh, and Alan D. Friedman. 2018. "Progression from the Common Lymphoid Progenitor to B/Myeloid PreproB and ProB Precursors during B Lymphopoiesis Requires C/EBPα." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 201 (6): 1692–1704. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800244.

Guo, Jin-Hu, Wei-Min Qu, Shan-Guang Chen, Xiao-Ping Chen, Ke Lv, Zhi-Li Huang, and Yi-Lan Wu. 2014. "Keeping the Right Time in Space: Importance of Circadian Clock and Sleep for Physiology and Performance of Astronauts." *Military Medical Research* 1: 23. https://doi.org/10.1186/2054-9369-1-23.

Gwin, K. A., M. B. Shapiro, J. J. Dolence, Z. L. Huang, and K. L. Medina. 2013. "Hoxa9 and Flt3 Signaling Synergistically Regulate an Early Checkpoint in Lymphopoiesis." *The Journal of Immunology* 191 (2): 745–54. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203294.

Hadeiba, Husein, Katharina Lahl, Abdolhossein Edalati, Cecilia Oderup, Aida Habtezion, Russell Pachynski, Linh Nguyen, Asma Ghodsi, Sarah Adler, and Eugene C. Butcher. 2012. "Plasmacytoid Dendritic Cells Transport Peripheral Antigens to the Thymus to Promote Central Tolerance." *Immunity* 36 (3): 438–50. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.017.

Haire, R. N., C. T. Amemiya, D. Suzuki, and G. W. Litman. 1990. "Eleven Distinct VH Gene Families and Additional Patterns of Sequence Variation Suggest a High Degree of Immunoglobulin Gene Complexity in a Lower Vertebrate, Xenopus Laevis." *The Journal of Experimental Medicine* 171 (5): 1721–37.

Haks, M. C., P. Krimpenfort, J. H. van den Brakel, and A. M. Kruisbeek. 1999. "Pre-TCR Signaling and Inactivation of P53 Induces Crucial Cell Survival Pathways in Pre-T Cells." *Immunity* 11 (1): 91–101.

Hammarlund, Erika, Matthew W. Lewis, Scott G. Hansen, Lisa I. Strelow, Jay A. Nelson, Gary J. Sexton, Jon M. Hanifin, and Mark K. Slifka. 2003. "Duration of Antiviral Immunity after Smallpox Vaccination." *Nature Medicine* 9 (9): 1131–37. https://doi.org/10.1038/nm917.

Handa, Robert J., Shaila K. Mani, and Rosalie M. Uht. 2012. "Estrogen Receptors and the Regulation of Neural Stress Responses." *Neuroendocrinology* 96 (2): 111–18. https://doi.org/10.1159/000338397.

Hardy, R. R. 2006. "B-1 B Cell Development." *The Journal of Immunology* 177 (5): 2749–54. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.2749.

Hargens, A. R., and D. E. Watenpaugh. 1996. "Cardiovascular Adaptation to Spaceflight." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 28 (8): 977–82.

Harris, H. J., Y. Kotelevtsev, J. J. Mullins, J. R. Seckl, and M. C. Holmes. 2001. "Intracellular Regeneration of Glucocorticoids by 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase (11beta-HSD)-1 Plays a Key Role in Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Analysis of 11beta-HSD-1-Deficient Mice." *Endocrinology* 142 (1): 114–20. https://doi.org/10.1210/endo.142.1.7887.

Harris, Robert S, Guy Frederic Marrian, and Kenneth Vivian Thimann. 1957. *Vitamins and Hormones: Advances in Research and Applications. Volume 15 Volume 15*. New York: Academic Press. http://site.ebrary.com/id/10244159.

Haynes, B. F., M. E. Martin, H. H. Kay, and J. Kurtzberg. 1988. "Early Events in Human T Cell Ontogeny. Phenotypic Characterization and Immunohistologic Localization of T Cell Precursors in Early Human Fetal Tissues." *The Journal of Experimental Medicine* 168 (3): 1061–80.

He, Zhiheng, Jian Ma, Ruiqing Wang, Jing Zhang, Zhaofeng Huang, Fei Wang, Subha Sen, Ellen V. Rothenberg, and Zuoming Sun. 2017. "A Two-Amino-Acid Substitution in the Transcription Factor RORγt Disrupts Its Function in TH17 Differentiation but Not in Thymocyte Development." *Nature Immunology* 18 (10): 1128–38. https://doi.org/10.1038/ni.3832.

Heer, Martina, and William H. Paloski. 2006. "Space Motion Sickness: Incidence, Etiology, and Countermeasures." *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 129 (1–2): 77–79. https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.07.014.

Heizmann, Beate, Philippe Kastner, and Susan Chan. 2018. "The Ikaros Family in Lymphocyte Development." *Current Opinion in Immunology* 51: 14–23. https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.11.005.

Henikoff, Steven. 2008. "Nucleosome Destabilization in the Epigenetic Regulation of Gene Expression." *Nature Reviews. Genetics* 9 (1): 15–26. https://doi.org/10.1038/nrg2206.

Herman, James P., Michelle M. Ostrander, Nancy K. Mueller, and Helmer Figueiredo. 2005. "Limbic System Mechanisms of Stress Regulation: Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 29 (8): 1201–13. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.08.006.

Herrmann, Diana, Christoph Buck, Isabelle Sioen, Yiannis Kouride, Staffan Marild, Dénes Molnár, Theodora Mouratidou, et al. 2015. "Impact of Physical Activity, Sedentary Behaviour and Muscle Strength on Bone Stiffness in 2-10-Year-Old Children-Cross-Sectional Results from the IDEFICS Study." *The International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity* 12 (September): 112. https://doi.org/10.1186/s12966-015-0273-6.

Hirose, Jun, Taku Kouro, Hideya Igarashi, Takafumi Yokota, Nobuo Sakaguchi, and Paul W. Kincade. 2002. "A Developing Picture of Lymphopoiesis in Bone Marrow." *Immunological Reviews* 189 (November): 28–40.

Holmes, M. C., M. Sangra, K. L. French, I. R. Whittle, J. Paterson, J. J. Mullins, and J. R. Seckl. 2006. "11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Protects the Neonatal Cerebellum from Deleterious Effects of Glucocorticoids." *Neuroscience* 137 (3): 865–73. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.09.037.

Holmes, Megan C., Christian T. Abrahamsen, Karen L. French, Janice M. Paterson, John J. Mullins, and Jonathan R. Seckl. 2006. "The Mother or the Fetus? 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Null Mice Provide Evidence for Direct Fetal Programming of Behavior by Endogenous

Glucocorticoids." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (14): 3840–44. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4464-05.2006.
Hosokawa, Hiroyuki, Jonas Ungerbäck, Xun Wang, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, Sarah M. Cohen, Tomoaki Tanaka, and Ellen V. Rothenberg. 2018. "Transcription Factor PU.1 Represses and Activates Gene Expression in Early T Cells by Redirecting Partner Transcription Factor Binding." *Immunity* 49 (4): 782. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.019.
Houssaint, E. 1981. "Differentiation of the Mouse Hepatic Primordium. II. Extrinsic Origin of the Haemopoietic Cell Line." *Cell Differentiation* 10 (5): 243–52.
Hsu, Lih-Yun, Josh Lauring, Hong-Erh Liang, Stephen Greenbaum, Dragana Cado, Yuan Zhuang, and Mark S. Schlissel. 2003. "A Conserved Transcriptional Enhancer Regulates RAG Gene Expression in Developing B Cells." *Immunity* 19 (1): 105–17. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00181-X.
Hu, Gangqing, Kairong Cui, Difeng Fang, Satoshi Hirose, Xun Wang, Darawalee Wangsa, Wenfei Jin, et al. 2018. "Transformation of Accessible Chromatin and 3D Nucleome Underlies Lineage Commitment of Early T Cells." *Immunity* 48 (2): 227-242.e8. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.013.
Hubert, François-Xavier, Sarah A. Kinkel, Gayle M. Davey, Belinda Phipson, Scott N. Mueller, Adrian Liston, Anna I. Proietto, et al. 2011. "Aire Regulates the Transfer of Antigen from MTECs to Dendritic Cells for Induction of Thymic Tolerance." *Blood* 118 (9): 2462–72. https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-286393.
Hughes, M. M., R. E. Tillman, T. D. Wehrly, J. M. White, and B. P. Sleckman. 2003. "The B12/23 Restriction Is Critically Dependent on Recombination Signal Nonamer and Spacer Sequences." *The Journal of Immunology* 171 (12): 6604–10. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6604.
Hunter, Morgan C., Alvaro Teijeira, and Cornelia Halin. 2016. "T Cell Trafficking through Lymphatic Vessels." *Frontiers in Immunology* 7 (December). https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00613.
Ignatowicz, L., J. Kappler, and P. Marrack. 1996. "The Repertoire of T Cells Shaped by a Single MHC/Peptide Ligand." *Cell* 84 (4): 521–29.
Inaba, M., K. Inaba, M. Hosono, T. Kumamoto, T. Ishida, S. Muramatsu, T. Masuda, and S. Ikehara. 1991. "Distinct Mechanisms of Neonatal Tolerance Induced by Dendritic Cells and Thymic B Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 173 (3): 549–59.
Ingber, D. 1999. "How Cells (Might) Sense Microgravity." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 Suppl: S3-15.
Isern, Joan, and Simón Méndez-Ferrer. 2011. "Stem Cell Interactions in a Bone Marrow Niche." *Current Osteoporosis Reports* 9 (4): 210–18. https://doi.org/10.1007/s11914-011-0075-y.
Isomäki, P., and J. Punnonen. 1997. "Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis." *Annals of Medicine* 29 (6): 499–507.
Itoh, S., Sakiko Yamada, Toyoki Mori, Takashi Miwa, Katsura Tottori, Yasufumi Uwahodo, Yoshitaka Yamamura, Meiko Fukuda, Koji Yamamoto, and Akito Tanoue. 2006. "Attenuated Stress-Induced Catecholamine Release in Mice Lacking the Vasopressin V1b Receptor." *AJP: Endocrinology and Metabolism* 291 (1): E147–51. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00005.2006.
Jabaaij, L., P. M. Grosheide, R. A. Heijtink, H. J. Duivenvoorden, R. E. Ballieux, and A. J. Vingerhoets. 1993. "Influence of Perceived Psychological Stress and Distress on Antibody Response to Low Dose RDNA Hepatitis B Vaccine." *Journal of Psychosomatic Research* 37 (4): 361–69.
Jacobs, Heinz, Dmitri Vandeputte, Louis Tolkamp, Evert De Vries, Jannie Borst, and Anton Berns. 1994. "CD3 Components at the Surface of Pro-T Cells Can Mediate Pre-T Cell Developmentin Vivo." *European Journal of Immunology* 24 (4): 934–39. https://doi.org/10.1002/eji.1830240423.

Janas, Michelle L., and Martin Turner. 2010. “Stromal Cell-Derived Factor 1α and CXCR4: Newly Defined Requirements for Efficient Thymic β-Selection.” *Trends in Immunology* 31 (10): 370–76. https://doi.org/10.1016/j.it.2010.07.002.

Johnson, Kristen, David L Pflugh, Duonan Yu, David G T Hesslein, Kuo-I Lin, Alfred L M Bothwell, Andrei Thomas-Tikhonenko, David G Schatz, and Kathryn Calame. 2004. “B Cell–Specific Loss of Histone 3 Lysine 9 Methylation in the VH Locus Depends on Pax5.” *Nature Immunology* 5 (8): 853–61. https://doi.org/10.1038/ni1099.

Jones, Derek D., Joel R. Wilmore, and David Allman. 2015. “Cellular Dynamics of Memory B Cell Populations: IgM+ and IgG+ Memory B Cells Persist Indefinitely as Quiescent Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195 (10): 4753–59. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501365.

Jones, Mary Elizabeth, and Yuan Zhuang. 2007. “Acquisition of a Functional T Cell Receptor during T Lymphocyte Development Is Enforced by HEB and E2A Transcription Factors.” *Immunity* 27 (6): 860–70. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.014.

Jones-Mason, Mary Elizabeth, Xudong Zhao, Dietmar Kappes, Anna Lasorella, Antonio Iavarone, and Yuan Zhuang. 2012. “E Protein Transcription Factors Are Required for the Development of CD4(+) Lineage T Cells.” *Immunity* 36 (3): 348–61. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.010.

Jønsson, V. 1985. “Comparison and Definition of Spleen and Lymph Node: A Phylogenetic Analysis.” *Journal of Theoretical Biology* 117 (4): 691–99.

Justement, Louis B. 2001. “The Role of the Protein Tyrosine Phosphatase CD45 in Regulation of B Lymphocyte Activation.” *International Reviews of Immunology* 20 (6): 713–38. https://doi.org/10.3109/08830180109045587.

Kaiko, Gerard E., Jay C. Horvat, Kenneth W. Beagley, and Philip M. Hansbro. 2008. “Immunological Decision-Making: How Does the Immune System Decide to Mount a Helper T-Cell Response?” *Immunology* 123 (3): 326–38. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x.

Kaur, Indreshpal, Elizabeth R Simons, Victoria A Castro, C Mark Ott, and Duane L Pierson. 2004. “Changes in Neutrophil Functions in Astronauts.” *Brain, Behavior, and Immunity* 18 (5): 443–50. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2003.10.005.

Kaur, Indreshpal, Elizabeth R. Simons, Victoria A. Castro, C. Mark Ott, and Duane L. Pierson. 2005. “Changes in Monocyte Functions of Astronauts.” *Brain, Behavior, and Immunity* 19 (6): 547–54. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.12.006.

Kawasaki, Takumi, and Taro Kawai. 2014. “Toll-like Receptor Signaling Pathways.” *Frontiers in Immunology* 5: 461. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461.

Kee, B. L., and C. Murre. 1998. “Induction of Early B Cell Factor (EBF) and Multiple B Lineage Genes by the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor E12.” *The Journal of Experimental Medicine* 188 (4): 699–713.

Kimzey, S. L. 1977. “Biomedical Results from Skylab.” Johnson, R. S. & Dietlein, L. F.

Kirstetter, Peggy, Mireille Thomas, Andrée Dierich, Philippe Kastner, and Susan Chan. 2002. “Ikaros Is Critical for B Cell Differentiation and Function.” *European Journal of Immunology* 32 (3): 720–30. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200203)32:3<720::AID-IMMU720>3.0.CO;2-P.

Kitamura, D., J. Roes, R. Kühn, and K. Rajewsky. 1991. “A B Cell-Deficient Mouse by Targeted Disruption of the Membrane Exon of the Immunoglobulin Mu Chain Gene.” *Nature* 350 (6317): 423–26. https://doi.org/10.1038/350423a0.

Kitraki, E., C. Kittas, and F. Stylianopoulou. 1997. “Glucocorticoid Receptor Gene Expression during Rat Embryogenesis. An in Situ Hybridization Study.” *Differentiation; Research in Biological Diversity* 62 (1): 21–31. https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1997.6210021.x.

Klein, L., and B. Kyewski. 2000. “Self-Antigen Presentation by Thymic Stromal Cells: A Subtle Division of Labor.” *Current Opinion in Immunology* 12 (2): 179–86.

Klein, Ludger, Maria Hinterberger, Gerald Wirnsberger, and Bruno Kyewski. 2009. “Antigen Presentation in the Thymus for Positive Selection and Central Tolerance Induction.” *Nature Reviews. Immunology* 9 (12): 833–44. https://doi.org/10.1038/nri2669.

Klein, Ludger, Bruno Kyewski, Paul M. Allen, and Kristin A. Hogquist. 2014. “Positive and Negative Selection of the T Cell Repertoire: What Thymocytes See (and Don’t See).” *Nature Reviews Immunology* 14 (6): 377–91. https://doi.org/10.1038/nri3667.

Klein, Sabra L., and Katie L. Flanagan. 2016. “Sex Differences in Immune Responses.” *Nature Reviews Immunology* 16 (10): 626–38. https://doi.org/10.1038/nri.2016.90.

Kohno, Shohei, Yui Yamashita, Tomoki Abe, Katsuya Hirasaka, Motoko Oarada, Ayako Ohno, Shigetada Teshima-Kondo, et al. 2012. “Unloading Stress Disturbs Muscle Regeneration through Perturbed Recruitment and Function of Macrophages.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 112 (10): 1773–82. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00103.2012.

Kolar, G. R., D. Mehta, P. C. Wilson, and J. D. Capra. 2006. “Diversity of the Ig Repertoire Is Maintained with Age in Spite of Reduced Germinal Centre Cells in Human Tonsil Lymphoid Tissue.” *Scandinavian Journal of Immunology* 64 (3): 314–24. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01817.x.

Kondo, Motonari. 2010. “Lymphoid and Myeloid Lineage Commitment in Multipotent Hematopoietic Progenitors: Roles of Bone Marrow Microenvironment.” *Immunological Reviews* 238 (1): 37–46. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00963.x.

Konstantinova, I. V., M. P. Rykova, A. T. Lesnyak, and E. A. Antropova. 1993. “Immune Changes during Long-Duration Missions.” *Journal of Leukocyte Biology* 54 (3): 189–201.

Kracker, Sven, and Andreas Radbruch. 2004. “Immunoglobulin Class Switching: In Vitro Induction and Analysis.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 271: 149–59. https://doi.org/10.1385/1-59259-796-3:149.

Kudwa, Andrea E., Robert F. McGivern, and Robert J. Handa. 2014. “Estrogen Receptor β and Oxytocin Interact to Modulate Anxiety-like Behavior and Neuroendocrine Stress Reactivity in Adult Male and Female Rats.” *Physiology & Behavior* 129 (April): 287–96. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.03.004.

Kumar, Ashok, Troy D. Humphreys, Kimberly N. Kremer, Patricia S. Bramati, Lavone Bradfield, Contessa E. Edgar, and Karen E. Hedin. 2006. “CXCR4 Physically Associates with the T Cell Receptor to Signal in T Cells.” *Immunity* 25 (2): 213–24. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.015.

Kuo, Tracy C., and Mark S. Schlissel. 2009. “Mechanisms Controlling Expression of the RAG Locus during Lymphocyte Development.” *Current Opinion in Immunology* 21 (2): 173–78. https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.03.008.

Labrie, Joseph E., Alex P. Sah, David M. Allman, Michael P. Cancro, and Rachel M. Gerstein. 2004. “Bone Marrow Microenvironmental Changes Underlie Reduced RAG-Mediated Recombination and B Cell Generation in Aged Mice.” *The Journal of Experimental Medicine* 200 (4): 411–23. https://doi.org/10.1084/jem.20040845.

Lattin, Christine R., Kaiden Waldron-Francis, Joyce W. Richardson, Robert de Bruijn, Carolyn M. Bauer, Creagh W. Breuner, and L. Michael Romero. 2012. “Pharmacological Characterization of Intracellular Glucocorticoid Receptors in Nine Tissues from House Sparrow (Passer Domesticus).” *General and Comparative Endocrinology* 179 (2): 214–20. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.08.007.

Laufer, T. M., J. DeKoning, J. S. Markowitz, D. Lo, and L. H. Glimcher. 1996. “Unopposed Positive Selection and Autoreactivity in Mice Expressing Class II MHC Only on Thymic Cortex.” *Nature* 383 (6595): 81–85. https://doi.org/10.1038/383081a0.

Laurenti, Elisa, Sergei Doulatov, Sasan Zandi, Ian Plumb, Jing Chen, Craig April, Jian-Bing Fan, and John E. Dick. 2013. “The Transcriptional Architecture of Early Human Hematopoiesis Identifies Multilevel Control of Lymphoid Commitment.” *Nature Immunology* 14 (7): 756–63. https://doi.org/10.1038/ni.2615.

Laurenti, Elisa, and Berthold Göttgens. 2018. “From Haematopoietic Stem Cells to Complex Differentiation Landscapes.” *Nature* 553 (7689): 418–26. https://doi.org/10.1038/nature25022.

Lauvau, Grégoire, and Saïdi M’Homa Soudja. 2015. “Mechanisms of Memory T Cell Activation and Effective Immunity.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 850: 73–80. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15774-0_6.

LeBien, T. W., and T. F. Tedder. 2008. “B Lymphocytes: How They Develop and Function.” *Blood* 112 (5): 1570–80. https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071.

Lee, Seoung Hoon, and Yongwon Choi. 2015. “Communication between the Skeletal and Immune Systems.” *Osteoporosis and Sarcopenia* 1 (2): 81–91. https://doi.org/10.1016/j.afos.2015.09.004.

Lennartsson, Andreas, and Karl Ekwall. 2009. “Histone Modification Patterns and Epigenetic Codes.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (9): 863–68. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.12.006.

Lescale, Chloé, Sheila Dias, Jérôme Maës, Ana Cumano, Paul Szabo, Dominique Charron, Marc E. Weksler, Christine Dosquet, Paulo Vieira, and Michele Goodhardt. 2010. “Reduced EBF Expression Underlies Loss of B-Cell Potential of Hematopoietic Progenitors with Age.” *Aging Cell* 9 (3): 410–19. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00566.x.

Lescale, Chloé, Véronique Schenten, Dounia Djeghloul, Meriem Bennabi, Fanny Gaignier, Katleen Vandamme, Catherine Strazielle, et al. 2015. “Hind Limb Unloading, a Model of Spaceflight Conditions, Leads to Decreased B Lymphopoiesis Similar to Aging.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (2): 455–63. https://doi.org/10.1096/fj.14-259770.

Letourneur, F, and R. Klausner. 1992. “Activation of T Cells by a Tyrosine Kinase Activation Domain in the Cytoplasmic Tail of CD3 Epsilon.” *Science* 255 (5040): 79–82. https://doi.org/10.1126/science.1532456.

Lewis, M. L., J. L. Reynolds, L. A. Cubano, J. P. Hatton, B. D. Lawless, and E. H. Piepmeier. 1998. “Spaceflight Alters Microtubules and Increases Apoptosis in Human Lymphocytes (Jurkat).” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12 (11): 1007–18.

Li, Hanjie, Congting Ye, Guoli Ji, Xiaohui Wu, Zhe Xiang, Yuanyue Li, Yonghao Cao, et al. 2012. “Recombinatorial Biases and Convergent Recombination Determine Interindividual TCRβ Sharing in Murine Thymocytes.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (5): 2404–13. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102087.

Li, Minghong, Veronica Holmes, Yu Zhou, Houping Ni, Jenine K. Sanzari, Ann R. Kennedy, and Drew Weissman. 2014. “Hindlimb Suspension and SPE-like Radiation Impairs Clearance of Bacterial Infections.” *PloS One* 9 (1): e85665. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085665.

Li, Qi, Qibing Mei, Ting Huyan, Li Xie, Su Che, Hui Yang, Mingjie Zhang, and Qingsheng Huang. 2013. “Effects of Simulated Microgravity on Primary Human NK Cells.” *Astrobiology* 13 (8): 703–14. https://doi.org/10.1089/ast.2013.0981.

Li, Z. 2004. “The Generation of Antibody Diversity through Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination.” *Genes & Development* 18 (1): 1–11. https://doi.org/10.1101/gad.1161904.

Lin, W. C., and S. Desiderio. 1994. “Cell Cycle Regulation of V(D)J Recombination-Activating Protein RAG-2.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (7): 2733–37.

Littleton, Sejiro, and Dylan Ludwick. 2015. “Altered Immune Function in Space: Implications of a Gravity Sensitive Cytoskeleton.” *Explorations*, 28.

Liu, Yun, Ramesh Subrahmanyam, Tirtha Chakraborty, Ranjan Sen, and Stephen Desiderio. 2007. “A Plant Homeodomain in Rag-2 That Binds Hypermethylated Lysine 4 of Histone H3 Is Necessary for Efficient Antigen-Receptor-Gene Rearrangement.” *Immunity* 27 (4): 561–71. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.005.

Longabaugh, William J. R., Weihua Zeng, Jingli A. Zhang, Hiroyuki Hosokawa, Camden S. Jansen, Long Li, Maile Romero-Wolf, et al. 2017. "Bcl11b and Combinatorial Resolution of Cell Fate in the T-Cell Gene Regulatory Network." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (23): 5800–5807. https://doi.org/10.1073/pnas.1610617114.

Lotan, A, T Lifschytz, G Wolf, S Keller, H Ben-Ari, P Tatarsky, N Pillar, et al. 2017. "Differential Effects of Chronic Stress in Young-Adult and Old Female Mice: Cognitive-Behavioral Manifestations and Neurobiological Correlates." *Molecular Psychiatry*, December. https://doi.org/10.1038/mp.2017.237.

Love, P. E., and S. M. Hayes. 2010. "ITAM-Mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (6): a002485–a002485. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002485.

Lu, Haihui, Noriko Shimazaki, Prafulla Raval, Jiafeng Gu, Go Watanabe, Klaus Schwarz, Patrick C. Swanson, and Michael R. Lieber. 2008. "A Biochemically Defined System for Coding Joint Formation in V(D)J Recombination." *Molecular Cell* 31 (4): 485–97. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.029.

Lu, Wenyan, Dominic Dordai, David Huso, and Stephen Desiderio. 2018. "Smoothened Signaling in the Mouse Osteoblastoid Lineage Is Required for Efficient B Lymphopoiesis." *Blood* 131 (3): 323–27. https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-793539.

Lucas, Joseph S., Cornelis Murre, Ann J. Feeney, and Roy Riblet. 2015. "The Structure and Regulation of the Immunoglobulin Loci." In *Molecular Biology of B Cells*, 1–11. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397933-9.00001-1.

Luheshi, G., and N. Rothwell. 1996. "Cytokines and Fever." *International Archives of Allergy and Immunology* 109 (4): 301–7. https://doi.org/10.1159/000237256.

Ma, Yunmei, Ulrich Pannicke, Klaus Schwarz, and Michael R. Lieber. 2002. "Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination." *Cell* 108 (6): 781–94. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00671-2.

Macallan, D. C. 2005. "B-Cell Kinetics in Humans: Rapid Turnover of Peripheral Blood Memory Cells." *Blood* 105 (9): 3633–40. https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3740.

Macfarlane, David P., Shareen Forbes, and Brian R. Walker. 2008. "Glucocorticoids and Fatty Acid Metabolism in Humans: Fuelling Fat Redistribution in the Metabolic Syndrome." *The Journal of Endocrinology* 197 (2): 189–204. https://doi.org/10.1677/JOE-08-0054.

Madsen, L., N. Labrecque, J. Engberg, A. Dierich, A. Svejgaard, C. Benoist, D. Mathis, and L. Fugger. 1999. "Mice Lacking All Conventional MHC Class II Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (18): 10338–43.

Maes, M., D. Hendriks, A. Van Gastel, P. Demedts, A. Wauters, H. Neels, A. Janca, and S. Scharpé. 1997. "Effects of Psychological Stress on Serum Immunoglobulin, Complement and Acute Phase Protein Concentrations in Normal Volunteers." *Psychoneuroendocrinology* 22 (6): 397–409.

Mahajan, K. N., L. Gangi-Peterson, D. H. Sorscher, J. Wang, K. N. Gathy, N. P. Mahajan, W. H. Reeves, and B. S. Mitchell. 1999. "Association of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase with Ku." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (24): 13926–31.

Malu, Shruti, Vidyasagar Malshetty, Dailia Francis, and Patricia Cortes. 2012. "Role of Non-Homologous End Joining in V(D)J Recombination." *Immunologic Research* 54 (1–3): 233–46. https://doi.org/10.1007/s12026-012-8329-z.

Manda, Gina, Monica Neagu, Alexandra Livescu, Carolina Constantin, C. Codreanu, and Alina Radulescu. 2003. "Imbalance of Peripheral B Lymphocytes and NK Cells in Rheumatoid Arthritis." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 7 (1): 79–88.

Manivel, Venkatasamy, Naresh C Sahoo, Dinakar M Salunke, and Kanury V.S Rao. 2000. "Maturation of an Antibody Response Is Governed by Modulations in Flexibility of the Antigen-Combining Site." *Immunity* 13 (5): 611–20. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00061-3.

Margueron, Raphaël, and Danny Reinberg. 2011. “The Polycomb Complex PRC2 and Its Mark in Life.” *Nature* 469 (7330): 343–49. https://doi.org/10.1038/nature09784.

Mariño-Ramírez, Leonardo, Maricel G Kann, Benjamin A Shoemaker, and David Landsman. 2005. “Histone Structure and Nucleosome Stability.” *Expert Review of Proteomics* 2 (5): 719–29. https://doi.org/10.1586/14789450.2.5.719.

Marr, Shauna, Heidi Morales, Andrea Bottaro, Michelle Cooper, Martin Flajnik, and Jacques Robert. 2007. “Localization and Differential Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase in the Amphibian Xenopus upon Antigen Stimulation and during Early Development.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (10): 6783–89.

Marshall, A. J., H. E. Fleming, G. E. Wu, and C. J. Paige. 1998. “Modulation of the IL-7 Dose-Response Threshold during pro-B Cell Differentiation Is Dependent on Pre-B Cell Receptor Expression.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (11): 6038–45.

Mårtensson, Inga-Lill, Nina Almqvist, Ola Grimsholm, and Angelina I. Bernardi. 2010. “The Pre-B Cell Receptor Checkpoint.” *FEBS Letters* 584 (12): 2572–79. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.057.

Martin, F., A. M. Oliver, and J. F. Kearney. 2001. “Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens.” *Immunity* 14 (5): 617–29.

Matthews, Adam G. W., Alex J. Kuo, Santiago Ramón-Maiques, Sunmi Han, Karen S. Champagne, Dmitri Ivanov, Mercedes Gallardo, et al. 2007. “RAG2 PHD Finger Couples Histone H3 Lysine 4 Trimethylation with V(D)J Recombination.” *Nature* 450 (7172): 1106–10. https://doi.org/10.1038/nature06431.

Maydych, Viktoriya, Maren Claus, Nicole Dychus, Melanie Ebel, Jürgen Damaschke, Stefan Diestel, Oliver T. Wolf, Thomas Kleinsorge, and Carsten Watzl. 2017. “Impact of Chronic and Acute Academic Stress on Lymphocyte Subsets and Monocyte Function.” *PloS One* 12 (11): e0188108. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188108.

McGregor, Bonnie A., Karly M. Murphy, Denise L. Albano, and Rachel M. Ceballos. 2016. “Stress, Cortisol, and B Lymphocytes: A Novel Approach to Understanding Academic Stress and Immune Function.” *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 19 (2): 185–91. https://doi.org/10.3109/10253890.2015.1127913.

McHeyzer-Williams, Michael, Shinji Okitsu, Nathaniel Wang, and Louise McHeyzer-Williams. 2012. “Molecular Programming of B Cell Memory.” *Nature Reviews Immunology* 12 (1): 24–34. https://doi.org/10.1038/nri3128.

Meaney, M. J., D. H. Aitken, S. Sharma, and V. Viau. 1992. “Basal ACTH, Corticosterone and Corticosterone-Binding Globulin Levels over the Diurnal Cycle, and Age-Related Changes in Hippocampal Type I and Type II Corticosteroid Receptor Binding Capacity in Young and Aged, Handled and Nonhandled Rats.” *Neuroendocrinology* 55 (2): 204–13. https://doi.org/10.1159/000126116.

Medina, Kay L., and Harinder Singh. 2005. “Genetic Networks That Regulate B Lymphopoiesis.” *Current Opinion in Hematology* 12 (3): 203–9.

Mehta, S. K., M. L. Laudenslager, R. P. Stowe, B. E. Crucian, C. F. Sams, and D. L. Pierson. 2014. “Multiple Latent Viruses Reactivate in Astronauts during Space Shuttle Missions.” *Brain, Behavior, and Immunity* 41 (October): 210–17. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.05.014.

Mehta, Satish K., Mark L. Laudenslager, Raymond P. Stowe, Brian E. Crucian, Alan H. Feiveson, Clarence F. Sams, and Duane L. Pierson. 2017. “Latent Virus Reactivation in Astronauts on the International Space Station.” *Npj Microgravity* 3 (1). https://doi.org/10.1038/s41526-017-0015-y.

Meloni, Maria Antonia, Grazia Galleri, Giuseppe Pani, Angela Saba, Proto Pippia, and Marianne Cogoli-Greuter. 2011. “Space Flight Affects Motility and Cytoskeletal Structures in Human Monocyte Cell Line J-111.” *Cytoskeleton* 68 (2): 125–37. https://doi.org/10.1002/cm.20499.

Michie, Alison M, and Juan Carlos Zúñiga-Pflücker. 2002. “Regulation of Thymocyte Differentiation: Pre-TCR Signals and β-Selection.” *Seminars in Immunology* 14 (5): 311–23. https://doi.org/10.1016/S1044-5323(02)00064-7.

Miller, Andrew H., Robert L. Spencer, Bradley D. Pearce, Tracy L. Pisell, Yevgeny Azrieli, Patima Tanapat, Heather Moday, Richard Rhee, and Bruce S. McEwen. 1998. “Glucocorticoid Receptors Are Differentially Expressed in the Cells and Tissues of the Immune System.” *Cellular Immunology* 186 (1): 45–54. https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1293.

Millet, Virginie, Philippe Naquet, and Rodolphe R. Guinamard. 2008. “Intercellular MHC Transfer between Thymic Epithelial and Dendritic Cells.” *European Journal of Immunology* 38 (5): 1257–63. https://doi.org/10.1002/eji.200737982.

Milne, C. D., S. A. Corfe, and C. J. Paige. 2008. “Heparan Sulfate and Heparin Enhance ERK Phosphorylation and Mediate PreBCR-Dependent Events during B Lymphopoiesis.” *The Journal of Immunology* 180 (5): 2839–47. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.2839.

Minegishi, Y., E. Coustan-Smith, Y. H. Wang, M. D. Cooper, D. Campana, and M. E. Conley. 1998. “Mutations in the Human Lambda5/14.1 Gene Result in B Cell Deficiency and Agammaglobulinemia.” *The Journal of Experimental Medicine* 187 (1): 71–77.

Mizoguchi, K., M. Yuzurihara, A. Ishige, H. Sasaki, D. H. Chui, and T. Tabira. 2001. “Chronic Stress Differentially Regulates Glucocorticoid Negative Feedback Response in Rats.” *Psychoneuroendocrinology* 26 (5): 443–59.

Moazzam, Sadia, M. Mazhar Hussain, and Tahir Aziz Ahmad. 2013. “Effect of Chronic Restraint Stress on Immune Status of Male Sprague Dawley Rats.” *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP* 23 (7): 487–90. https://doi.org/07.2013/JCPSP.487490.

Mochizuki-Kashio, Makiko, Yuta Mishima, Satoru Miyagi, Masamitsu Negishi, Atsunori Saraya, Takaaki Konuma, Jun Shinga, Haruhiko Koseki, and Atsushi Iwama. 2011. “Dependency on the Polycomb Gene Ezh2 Distinguishes Fetal from Adult Hematopoietic Stem Cells.” *Blood* 118 (25): 6553–61. https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340554.

Modir, Fatemeh, Mahmoud Elahdadi Salmani, Iran Goudarzi, Taghi Lashkarboluki, and Kataneh Abrari. 2014. “Prenatal Stress Decreases Spatial Learning and Memory Retrieval of the Adult Male Offspring of Rats.” *Physiology & Behavior* 129 (April): 104–9. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.040.

Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. “RAG-1-Deficient Mice Have No Mature B and T Lymphocytes.” *Cell* 68 (5): 869–77.

Morahan, G., L. Malcolm, and J. F. Miller. 1987. “Expression of T Cell Antigen Receptor and Immunoglobulin Genes in Lymphoid Organs Visualized by in Situ Hybridization.” *The EMBO Journal* 6 (12): 3679–85.

Morey-Holton, Emily, Ruth K. Globus, Alexander Kaplansky, and Galina Durnova. 2005. “The Hindlimb Unloading Rat Model: Literature Overview, Technique Update and Comparison with Space Flight Data.” In *Advances in Space Biology and Medicine*, 10:7–40. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S1569-2574(05)10002-1.

Morey-Holton, Emily R., and Ruth K. Globus. 2002. “Hindlimb Unloading Rodent Model: Technical Aspects.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 92 (4): 1367–77. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00969.2001.

Morimura, Toshifumi, Ryo Goitsuka, Yong Zhang, Izumu Saito, Michael Reth, and Daisuke Kitamura. 2000. “Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Notch1 in B Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 275 (47): 36523–31. https://doi.org/10.1074/jbc.M006415200.

Morukov, B., M. Rykova, E. Antropova, T. Berendeeva, S. Ponomaryov, and I. Larina. 2011. “T-Cell Immunity and Cytokine Production in Cosmonauts after Long-Duration Space Flights.” *Acta Astronautica* 68 (7–8): 739–46. https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2010.08.036.

Morukov, B. V., M. P. Rykova, E. N. Antropova, T. A. Berendeeva, S. A. Ponomaryov, and I. M. Larina. 2010. “Parameters of the Innate and Adaptive Immunity in Cosmonauts after Long-Term Space Flight on Board the International Space Station.” *Human Physiology* 36 (3): 264–73. https://doi.org/10.1134/S0362119710030035.

Moshous, D., I. Callebaut, R. de Chasseval, B. Corneo, M. Cavazzana-Calvo, F. Le Deist, I. Tezcan, et al. 2001. "Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency." *Cell* 105 (2): 177–86.

Mueller, Scott N., Thomas Gebhardt, Francis R. Carbone, and William R. Heath. 2013. "Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence." *Annual Review of Immunology* 31 (1): 137–61. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095954.

Murciano, Celia, Alberto Yáñez, José E. O'Connor, Daniel Gozalbo, and María Luisa Gil. 2008. "Influence of Aging on Murine Neutrophil and Macrophage Function against *Candida Albicans*." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 53 (2): 214–21. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00418.x.

Murray, Janet M., Terri Messier, Jami Rivers, J. Patrick O'Neill, Vernon E. Walker, Pamela M. Vacek, and Barry A. Finette. 2012. "VDJ Recombinase-Mediated TCR β Locus Gene Usage and Coding Joint Processing in Peripheral T Cells during Perinatal and Pediatric Development." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (5): 2356–64. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200382.

Nagaoka, H., W. Yu, and M. C. Nussenzweig. 2000. "Regulation of RAG Expression in Developing Lymphocytes." *Current Opinion in Immunology* 12 (2): 187–90.

Nagasawa, Takashi. 2015. "CXCL12/SDF-1 and CXCR4." *Frontiers in Immunology* 6 (June). https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00301.

Nakase, Hiroshi, Yousuke Takahama, and Yoshiko Akamatsu. 2003. "Effect of CpG Methylation on RAG1/RAG2 Reactivity: Implications of Direct and Indirect Mechanisms for Controlling V(D)J Cleavage." *EMBO Reports* 4 (8): 774–80. https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor904.

Nakatani, Yoshihiko, Taku Amano, and Hiroshi Takeda. 2013. "Corticosterone Suppresses the Proliferation of RAW264.7 Macrophage Cells via Glucocorticoid, But Not Mineralocorticoid, Receptor." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 36 (4): 592–601. https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00968.

Nash, P. 1991. "Effect of Hindlimb Suspension Simulation of Microgravity on in Vitro Immunological Responses*1." *Experimental Cell Research* 195 (2): 353–60. https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90384-7.

Ndifon, Wilfred, Hilah Gal, Eric Shifrut, Rina Aharoni, Nissan Yissachar, Nir Waysbort, Shlomit Reich-Zeliger, Ruth Arnon, and Nir Friedman. 2012. "Chromatin Conformation Governs T-Cell Receptor Jβ Gene Segment Usage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (39): 15865–70. https://doi.org/10.1073/pnas.1203916109.

Neefjes, Jacques, Marlieke L. M. Jongsma, Petra Paul, and Oddmund Bakke. 2011. "Towards a Systems Understanding of MHC Class I and MHC Class II Antigen Presentation." *Nature Reviews. Immunology* 11 (12): 823–36. https://doi.org/10.1038/nri3084.

Nelson, Emily S., Lealem Mulugeta, and Jerry G. Myers. 2014. "Microgravity-Induced Fluid Shift and Ophthalmic Changes." *Life (Basel, Switzerland)* 4 (4): 621–65. https://doi.org/10.3390/life4040621.

Nemazee, D. A., and K. Bürki. 1989. "Clonal Deletion of B Lymphocytes in a Transgenic Mouse Bearing Anti-MHC Class I Antibody Genes." *Nature* 337 (6207): 562–66. https://doi.org/10.1038/337562a0.

Nemazee, David. 2017. "Mechanisms of Central Tolerance for B Cells." *Nature Reviews. Immunology* 17 (5): 281–94. https://doi.org/10.1038/nri.2017.19.

Ng, Kenneth Kh, Mary A. Yui, Arnav Mehta, Sharmayne Siu, Blythe Irwin, Shirley Pease, Satoshi Hirose, Michael B. Elowitz, Ellen V. Rothenberg, and Hao Yuan Kueh. 2018. "A Stochastic Epigenetic Switch Controls the Dynamics of T-Cell Lineage Commitment." *ELife* 7. https://doi.org/10.7554/eLife.37851.

Nickerson, C. A., C. M. Ott, S. J. Mister, B. J. Morrow, L. Burns-Keliher, and D. L. Pierson. 2000. "Microgravity as a Novel Environmental Signal Affecting Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Virulence." *Infection and Immunity* 68 (6): 3147–52.

Niederkorn, Jerry Y. 2003. “Mechanisms of Immune Privilege in the Eye and Hair Follicle.” *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings* 8 (2): 168–72. https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2003.00803.x.

Nielsen, Morten, Claus Lundegaard, Ole Lund, and Thomas Nordahl Petersen. 2010. “CPHmodels-3.0--Remote Homology Modeling Using Structure-Guided Sequence Profiles.” *Nucleic Acids Research* 38 (Web Server issue): W576-581. https://doi.org/10.1093/nar/gkq535.

Nomellini, Vanessa, Douglas E. Faunce, Christian R. Gomez, and Elizabeth J. Kovacs. 2008. “An Age-Associated Increase in Pulmonary Inflammation after Burn Injury Is Abrogated by CXCR2 Inhibition.” *Journal of Leukocyte Biology* 83 (6): 1493–1501. https://doi.org/10.1189/jlb.1007672.

North, Benjamin, Andreas Lehmann, and Roland L. Dunbrack. 2011. “A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations.” *Journal of Molecular Biology* 406 (2): 228–56. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.10.030.

Nutt, S. L., P. Urbánek, A. Rolink, and M. Busslinger. 1997. “Essential Functions of Pax5 (BSAP) in pro-B Cell Development: Difference between Fetal and Adult B Lymphopoiesis and Reduced V-to-DJ Recombination at the IgH Locus.” *Genes & Development* 11 (4): 476–91.

Ohnishi, Kazuo, and Fritz Melchers. 2003. “The Nonimmunoglobulin Portion of Lambda5 Mediates Cell-Autonomous Pre-B Cell Receptor Signaling.” *Nature Immunology* 4 (9): 849–56. https://doi.org/10.1038/ni959.

Olaru, Alexandru, Dimeka N. Patterson, Hongrong Cai, and Ferenc Livák. 2004. “Recombination Signal Sequence Variations and the Mechanism of Patterned T-Cell Receptor-Beta Locus Rearrangement.” *Molecular Immunology* 40 (16): 1189–1201.

Oliver, A. M., F. Martin, and J. F. Kearney. 1999. “IgMhighCD21high Lymphocytes Enriched in the Splenic Marginal Zone Generate Effector Cells More Rapidly than the Bulk of Follicular B Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (12): 7198–7207.

Osipovich, Oleg, Robin Milley, Amber Meade, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai, Michael S Krangel, and Eugene M Oltz. 2004. “Targeted Inhibition of V(D)J Recombination by a Histone Methyltransferase.” *Nature Immunology* 5 (3): 309–16. https://doi.org/10.1038/ni1042.

Outters, Pernelle, Sébastien Jaeger, Nancy Zaarour, and Pierre Ferrier. 2015. “Long-Range Control of V(D)J Recombination & Allelic Exclusion.” In *Advances in Immunology*, 128:363–413. Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.08.002.

Padovan, E, G Casorati, P Dellabona, S Meyer, M Brockhaus, and A Lanzavecchia. 1993. “Expression of Two T Cell Receptor Alpha Chains: Dual Receptor T Cells.” *Science* 262 (5132): 422–24. https://doi.org/10.1126/science.8211163.

Pagel, J. I., and A. Choukèr. 2016. “Effects of Isolation and Confinement on Humans-Implications for Manned Space Explorations.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 120 (12): 1449–57. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00928.2015.

Pahwa, Rajendra N., Mukund J. Modak, Teresa McMorrow, Savita Pahwa, Gabriel Fernandes, and Robert A. Good. 1981. “Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) Enzyme in Thymus and Bone Marrow.” *Cellular Immunology* 58 (1): 39–48. https://doi.org/10.1016/0008-8749(81)90147-7.

Palkovits, M. 1981. “Catecholamines in the Hypothalamus: An Anatomical Review.” *Neuroendocrinology* 33 (2): 123–28. https://doi.org/10.1159/000123215.

Panaroni, Cristina, and Joy Y. Wu. 2013. “Interactions Between B Lymphocytes and the Osteoblast Lineage in Bone Marrow.” *Calcified Tissue International* 93 (3): 261–68. https://doi.org/10.1007/s00223-013-9753-3.

Pang, Swee Heng Milon, Carolyn A. de Graaf, Douglas J. Hilton, Nicholas D. Huntington, Sebastian Carotta, Li Wu, and Stephen L. Nutt. 2018. “PU.1 Is Required for the Developmental Progression of Multipotent Progenitors to Common Lymphoid Progenitors.” *Frontiers in Immunology* 9: 1264. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01264.

Papaemmanuil, Elli, Inmaculada Rapado, Yilong Li, Nicola E Potter, David C Wedge, Jose Tubio, Ludmil B Alexandrov, et al. 2014. “RAG-Mediated Recombination Is the Predominant Driver of

Oncogenic Rearrangement in ETV6-RUNX1 Acute Lymphoblastic Leukemia." *Nature Genetics* 46 (2): 116–25. https://doi.org/10.1038/ng.2874.

Pardon, M., P. Gérardin, C. Joubert, F. Pérez-Diaz, and C. Cohen-Salmon. 2000. "Influence of Prepartum Chronic Ultramild Stress on Maternal Pup Care Behavior in Mice." *Biological Psychiatry* 47 (10): 858–63.

Paré, W. P., G. R. Blair, J. Kluczynski, and S. Tejani-Butt. 1999. "Gender Differences in Acute and Chronic Stress in Wistar Kyoto (WKY) Rats." *Integrative Physiological and Behavioral Science: The Official Journal of the Pavlovian Society* 34 (4): 227–41.

Pariante, Carmine M., and Stafford L. Lightman. 2008. "The HPA Axis in Major Depression: Classical Theories and New Developments." *Trends in Neurosciences* 31 (9): 464–68. https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006.

Pascuan, Cecilia Gabriela, Mara Roxana Rubinstein, María Laura Palumbo, and Ana María Genaro. 2014. "Prenatal Stress Induces Up-Regulation of Glucocorticoid Receptors on Lymphoid Cells Modifying the T-Cell Response after Acute Stress Exposure in the Adult Life." *Physiology & Behavior* 128 (April): 141–47. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.040.

Patel, H. M., and E. Hsu. 1997. "Abbreviated Junctional Sequences Impoverish Antibody Diversity in Urodele Amphibians." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159 (7): 3391–99.

Patel, P. D., J. F. Lopez, D. M. Lyons, S. Burke, M. Wallace, and A. F. Schatzberg. 2000. "Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptor MRNA Expression in Squirrel Monkey Brain." *Journal of Psychiatric Research* 34 (6): 383–92.

Patton, Daniel T., Adam W. Plumb, and Ninan Abraham. 2014. "The Survival and Differentiation of Pro-B and Pre-B Cells in the Bone Marrow Is Dependent on IL-7Rα Tyr449." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193 (7): 3446–55. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302925.

Paulsen, Katrin, Svantje Tauber, Nadine Goelz, Dana Michaela Simmet, Stephanie Engeli, Maria Birlem, Claudia Dumrese, et al. 2014. "Severe Disruption of the Cytoskeleton and Immunologically Relevant Surface Molecules in a Human Macrophageal Cell Line in Microgravity—Results of an in Vitro Experiment on Board of the Shenzhou-8 Space Mission." *Acta Astronautica* 94 (1): 277–92. https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2013.06.007.

Paulsen, Katrin, Cora Thiel, Johanna Timm, Peter M. Schmidt, Kathrin Huber, Svantje Tauber, Ruth Hemmersbach, et al. 2010. "Microgravity-Induced Alterations in Signal Transduction in Cells of the Immune System." *Acta Astronautica* 67 (9–10): 1116–25. https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2010.06.053.

Pelanda, Roberta, Uschi Braun, Elias Hobeika, Michel C. Nussenzweig, and Michael Reth. 2002. "B Cell Progenitors Are Arrested in Maturation but Have Intact VDJ Recombination in the Absence of Ig-Alpha and Ig-Beta." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (2): 865–72.

Pellis, N. R., T. J. Goodwin, D. Risin, B. W. McIntyre, R. P. Pizzini, D. Cooper, T. L. Baker, and G. F. Spaulding. 1997. "Changes in Gravity Inhibit Lymphocyte Locomotion through Type I Collagen." *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 33 (5): 398–405. https://doi.org/10.1007/s11626-997-0012-7.

Perera, Jason, and Haochu Huang. 2015. "The Development and Function of Thymic B Cells." *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (14): 2657–63. https://doi.org/10.1007/s00018-015-1895-1.

Pfaffl, Michael W., Ales Tichopad, Christian Prgomet, and Tanja P. Neuvians. 2004. "Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: BestKeeper--Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations." *Biotechnology Letters* 26 (6): 509–15.

Piemonti, L., P. Monti, P. Allavena, M. Sironi, L. Soldini, B. E. Leone, C. Socci, and V. Di Carlo. 1999. "Glucocorticoids Affect Human Dendritic Cell Differentiation and Maturation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (11): 6473–81.

Pillai, Shiv, Annaiah Cariappa, and Stewart T. Moran. 2005. "Marginal Zone B Cells." *Annual Review of Immunology* 23: 161–96. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115728.

Pippia, P., G. Galleri, M.A. Meloni, A. Saba, G. Pani, M. Cogoli-Greuter, and A. Cogoli. 2011. "Effects of Microgravity and Cosmic Radiations on Human T Lymphocytes." *Journal of Biological Research - Bollettino Della Società Italiana Di Biologia Sperimentale* 82 (1). https://doi.org/10.4081/jbr.2009.4697.

Plotkin, J., S. E. Prockop, A. Lepique, and H. T. Petrie. 2003. "Critical Role for CXCR4 Signaling in Progenitor Localization and T Cell Differentiation in the Postnatal Thymus." *The Journal of Immunology* 171 (9): 4521–27. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4521.

Poe, Jonathan C., Minoru Hasegawa, and Thomas F. Tedder. 2001. "CD19, CD21, and CD22: Multifaceted Response Regulators of B Lymphocyte Signal Transduction." *International Reviews of Immunology* 20 (6): 739–62. https://doi.org/10.3109/08830180109045588.

Prabhakar, Mamatha, William B Ershler, and Dan L Longo. 2009. "Bone Marrow, Thymus and Blood: Changes across the Lifespan." *Aging Health* 5 (3): 385–93. https://doi.org/10.2217/ahe.09.31.

Proietto, Anna I., Serani van Dommelen, Penghui Zhou, Alexandra Rizzitelli, Angela D'Amico, Raymond J. Steptoe, Shalin H. Naik, et al. 2008. "Dendritic Cells in the Thymus Contribute to T-Regulatory Cell Induction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (50): 19869–74. https://doi.org/10.1073/pnas.0810268105.

Pui, J. C., D. Allman, L. Xu, S. DeRocco, F. G. Karnell, S. Bakkour, J. Y. Lee, et al. 1999. "Notch1 Expression in Early Lymphopoiesis Influences B versus T Lineage Determination." *Immunity* 11 (3): 299–308.

Raaphorst, F. M., C. S. Raman, J. Tami, M. Fischbach, and I. Sanz. 1997. "Human Ig Heavy Chain CDR3 Regions in Adult Bone Marrow Pre-B Cells Display an Adult Phenotype of Diversity: Evidence for Structural Selection of DH Amino Acid Sequences." *International Immunology* 9 (10): 1503–15.

Radtke, F., A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H. R. MacDonald, and M. Aguet. 1999. "Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of Notch1." *Immunity* 10 (5): 547–58.

Ramsey, C. 2002. "Aire Deficient Mice Develop Multiple Features of APECED Phenotype and Show Altered Immune Response." *Human Molecular Genetics* 11 (4): 397–409. https://doi.org/10.1093/hmg/11.4.397.

Ranabir, Salam, and K Reetu. 2011. "Stress and Hormones." *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 15 (1): 18. https://doi.org/10.4103/2230-8210.77573.

Rapaport, A., Y. Allaire, F. Bourlière, and F. Girard. 1964. "Réactivité Au 'Stress' et Capacité d'adaptation à Une Situation Inhabituelle Chez Le Rat Jeune, Adulte et Âgé." *Gerontology* 10 (1): 20–30. https://doi.org/10.1159/000211370.

Rechavi, Erez, Atar Lev, Yu Nee Lee, Amos J. Simon, Yoav Yinon, Schlomo Lipitz, Ninette Amariglio, Boaz Weisz, Luigi D. Notarangelo, and Raz Somech. 2015. "Timely and Spatially Regulated Maturation of B and T Cell Repertoire during Human Fetal Development." *Science Translational Medicine* 7 (276): 276ra25. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0072.

Rie, Menno A. de, Ton N.M. Schumacher, Gijs M.W. van Schijndel, RenéA.W. van Lier, and Frank Miedema. 1989. "Regulatory Role of CD19 Molecules in B-Cell Activation and Differentiation." *Cellular Immunology* 118 (2): 368–81. https://doi.org/10.1016/0008-8749(89)90385-7.

Riley, Richard L. 2013. "Impaired B Lymphopoiesis in Old Age: A Role for Inflammatory B Cells?" *Immunologic Research* 57 (1–3): 361–69. https://doi.org/10.1007/s12026-013-8444-5.

Riley, S. C., B. G. Froscher, P. J. Linton, D. Zharhary, K. Marcu, and N. R. Klinman. 1989. "Altered VH Gene Segment Utilization in the Response to Phosphorylcholine by Aged Mice." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 143 (11): 3798–3805.

Rinner, I., K. Schauenstein, H. Mangge, S. Porta, and R. Kvetnansky. 1992. "Opposite Effects of Mild and Severe Stress on in Vitro Activation of Rat Peripheral Blood Lymphocytes." *Brain, Behavior, and Immunity* 6 (2): 130–40.

Rittweger, Jörn, Keith Winwood, Olivier Seynnes, Maarten de Boer, Desirée Wilks, Rosalind Lea, Michael Rennie, and Marco Narici. 2006. “Bone Loss from the Human Distal Tibia Epiphysis during 24 Days of Unilateral Lower Limb Suspension.” *The Journal of Physiology* 577 (Pt 1): 331–37. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115782.

Romagnani, S. 1991. “Type 1 T Helper and Type 2 T Helper Cells: Functions, Regulation and Role in Protection and Disease.” *International Journal of Clinical & Laboratory Research* 21 (2): 152–58.

Romanow, W. J., A. W. Langerak, P. Goebel, I. L. Wolvers-Tettero, J. J. van Dongen, A. J. Feeney, and C. Murre. 2000. “E2A and EBF Act in Synergy with the V(D)J Recombinase to Generate a Diverse Immunoglobulin Repertoire in Nonlymphoid Cells.” *Molecular Cell* 5 (2): 343–53.

Rosenne, Ella, Liat Sorski, Lee Shaashua, Elad Neeman, Pini Matzner, Ben Levi, and Shamgar Ben-Eliyahu. 2014. “In Vivo Suppression of NK Cell Cytotoxicity by Stress and Surgery: Glucocorticoids Have a Minor Role Compared to Catecholamines and Prostaglandins.” *Brain, Behavior, and Immunity* 37 (March): 207–19. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.007.

Rosenstein, Yvonne, Angelica Santana, and Gustavo Pedraza-Alva. 1999. “CD43, a Molecule with Multiple Functions.” *Immunologic Research* 20 (3): 89–99. https://doi.org/10.1007/BF02786465.

Roth, David B. 2014. “V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity.” *Microbiology Spectrum* 2 (6). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0041-2014.

Rothenberg, Ellen V. 2016. “Multiple Curricula for B Cell Developmental Programming.” *Immunity* 45 (3): 457–58. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.005.

———. 2017. “Fitting Structure to Function in Gene Regulatory Networks.” *History and Philosophy of the Life Sciences* 39 (4): 37. https://doi.org/10.1007/s40656-017-0164-z.

Rykova, M.P., E.N. Antropova, I.M. Larina, and B.V. Morukov. 2008. “Humoral and Cellular Immunity in Cosmonauts after the ISS Missions.” *Acta Astronautica* 63 (7–10): 697–705. https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2008.03.016.

Saint-Mezard, P., C. Chavagnac, S. Bosset, M. Ionescu, E. Peyron, D. Kaiserlian, J.-F. Nicolas, and F. Berard. 2003. “Psychological Stress Exerts an Adjuvant Effect on Skin Dendritic Cell Functions In Vivo.” *The Journal of Immunology* 171 (8): 4073–80. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.8.4073.

Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. “Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions.” *Nature* 401 (6754): 708–12. https://doi.org/10.1038/44385.

Sambandam, Arivazhagan, J. Jeremiah Bell, Benjamin A. Schwarz, Valerie P. Zediak, Anthony W. Chi, Daniel A. Zlotoff, Shanthi Lakshmi Krishnamoorthy, Jennifer M. Burg, and Avinash Bhandoola. 2008. “Progenitor Migration to the Thymus and T Cell Lineage Commitment.” *Immunologic Research* 42 (1–3): 65–74. https://doi.org/10.1007/s12026-008-8035-z.

Sandel, P. C., and J. G. Monroe. 1999. “Negative Selection of Immature B Cells by Receptor Editing or Deletion Is Determined by Site of Antigen Encounter.” *Immunity* 10 (3): 289–99.

Schaerlinger, Bérénice, Matthieu Bascove, and Jean-Pol Frippiat. 2008. “A New Isotype of Immunoglobulin Heavy Chain in the Urodele Amphibian Pleurodeles Waltl Predominantly Expressed in Larvae.” *Molecular Immunology* 45 (3): 776–86. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.356.

Schenten, Véronique, Nathan Guéguinou, Sarah Baatout, and Jean-Pol Frippiat. 2013. “Modulation of Pleurodeles Waltl DNA Polymerase Mu Expression by Extreme Conditions Encountered during Spaceflight.” Edited by John R. Battista. *PLoS ONE* 8 (7): e69647. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069647.

Schettino, E. W., S. K. Chai, M. T. Kasaian, H. W. Schroeder, and P. Casali. 1997. “VHDJH Gene Sequences and Antigen Reactivity of Monoclonal Antibodies Produced by Human B-1 Cells: Evidence for Somatic Selection.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158 (5): 2477–89.

Schietinger, Andrea, and Philip D. Greenberg. 2014. “Tolerance and Exhaustion: Defining Mechanisms of T Cell Dysfunction.” *Trends in Immunology* 35 (2): 51–60. https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.001.

Schleifer, S. J., S. E. Keller, M. Camerino, J. C. Thornton, and M. Stein. 1983. “Suppression of Lymphocyte Stimulation Following Bereavement.” *JAMA* 250 (3): 374–77.

Schleifer, S. J., S. E. Keller, A. T. Meyerson, M. J. Raskin, K. L. Davis, and M. Stein. 1984. “Lymphocyte Function in Major Depressive Disorder.” *Archives of General Psychiatry* 41 (5): 484–86.

Schlissel, Mark S. 2002. “Does Artemis End the Hunt for the Hairpin-Opening Activity in V(D)J Recombination?” *Cell* 109 (1): 1–4.

Schroeder, Harry W. 2006. “Similarity and Divergence in the Development and Expression of the Mouse and Human Antibody Repertoires.” *Developmental & Comparative Immunology* 30 (1–2): 119–35. https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.006.

Schwager, J., N. Bürckert, M. Courtet, and L. Du Pasquier. 1991. “The Ontogeny of Diversification at the Immunoglobulin Heavy Chain Locus in Xenopus.” *The EMBO Journal* 10 (9): 2461–70.

Sciola, L., M. Cogoli-Greuter, A. Cogoli, A. Spano, and P. Pippia. 1999. “Influence of Microgravity on Mitogen Binding and Cytoskeleton in Jurkat Cells.” *Advances in Space Research* 24 (6): 801–5. https://doi.org/10.1016/S0273-1177(99)00078-2.

Scott, E., M. Simon, J Anastasi, and H Singh. 1994. “Requirement of Transcription Factor PU.1 in the Development of Multiple Hematopoietic Lineages.” *Science* 265 (5178): 1573–77. https://doi.org/10.1126/science.8079170.

Seckl, J. R., K. L. Dickson, C. Yates, and G. Fink. 1991. “Distribution of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptor Messenger RNA Expression in Human Postmortem Hippocampus.” *Brain Research* 561 (2): 332–37.

Segerstrom, Suzanne C., and Gregory E. Miller. 2004. “Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry.” *Psychological Bulletin* 130 (4): 601–30. https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.4.601.

Selimyan, Roza, Rachel M. Gerstein, Irina Ivanova, Patricia Precht, Ramesh Subrahmanyam, Thomas Perlot, Frederick W. Alt, and Ranjan Sen. 2013. “Localized DNA Demethylation at Recombination Intermediates during Immunoglobulin Heavy Chain Gene Assembly.” Edited by David Nemazee. *PLoS Biology* 11 (1): e1001475. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001475.

Selye, H. 1956. *The Stress of Life*. vol. 5. McGraw-Hill. https://books.google.fr/books?id=DGFIAAAAMAAJ.

———. 1975. “Stress and Distress.” *Comprehensive Therapy* 1 (8): 9–13.

Sesti-Costa, R., M.D.C. Ignacchiti, S. Chedraoui-Silva, L.F. Marchi, and B. Mantovani. 2012. “Chronic Cold Stress in Mice Induces a Regulatory Phenotype in Macrophages: Correlation with Increased 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Expression.” *Brain, Behavior, and Immunity* 26 (1): 50–60. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.07.234.

Sethna, Zachary, Yuval Elhanati, Chrissy S. Dudgeon, Curtis G. Callan, Arnold J. Levine, Thierry Mora, and Aleksandra M. Walczak. 2017. “Insights into Immune System Development and Function from Mouse T-Cell Repertoires.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (9): 2253–58. https://doi.org/10.1073/pnas.1700241114.

Sharma, Mukesh Kumar, Shoji Imamichi, Mikoto Fukuchi, Ravindra Mahadeo Samarth, Masanori Tomita, and Yoshihisa Matsumoto. 2016. “In Cellulo Phosphorylation of XRCC4 Ser320 by DNA-PK Induced by DNA Damage.” *Journal of Radiation Research* 57 (2): 115–20. https://doi.org/10.1093/jrr/rrv086.

Shimba, Akihiro, Guangwei Cui, Shizue Tani-Ichi, Makoto Ogawa, Shinya Abe, Fumie Okazaki, Satsuki Kitano, et al. 2018. “Glucocorticoids Drive Diurnal Oscillations in T Cell Distribution and Responses by Inducing Interleukin-7 Receptor and CXCR4.” *Immunity* 48 (2): 286-298.e6. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.004.

Shimizu, Takeyuki, Cornelia Mundt, Steve Licence, Fritz Melchers, and Inga-Lill Mårtensson. 2002. “VpreB1/VpreB2/Lambda 5 Triple-Deficient Mice Show Impaired B Cell Development but

Functional Allelic Exclusion of the IgH Locus." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (12): 6286–93.

Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, and A. M. Stall. 1992. "RAG-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V(D)J Rearrangement." *Cell* 68 (5): 855–67.

Shinnakasu, Ryo, and Tomohiro Kurosaki. 2017. "Regulation of Memory B and Plasma Cell Differentiation." *Current Opinion in Immunology* 45 (April): 126–31. https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.003.

Shukla, Vivek, Thomas Vaissière, and Zdenko Herceg. 2008. "Histone Acetylation and Chromatin Signature in Stem Cell Identity and Cancer." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 637 (1–2): 1–15. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.07.012.

Sierra, Marta I., Agustín F. Fernández, and Mario F. Fraga. 2015. "Epigenetics of Aging." *Current Genomics* 16 (6): 435–40. https://doi.org/10.2174/1389202916666150817203459.

Silva, Elaine Zayas Marcelino da, Maria Célia Jamur, and Constance Oliver. 2014. "Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 62 (10): 698–738. https://doi.org/10.1369/0022155414545334.

Singh, H., K. L. Medina, and J. M. R. Pongubala. 2005. "Contingent Gene Regulatory Networks and B Cell Fate Specification." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (14): 4949–53. https://doi.org/10.1073/pnas.0500480102.

Singleton, B. K., M. I. Torres-Arzayus, S. T. Rottinghaus, G. E. Taccioli, and P. A. Jeggo. 1999. "The C Terminus of Ku80 Activates the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit." *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3267–77.

Sleckman, B. P., C. H. Bassing, M. M. Hughes, A. Okada, M. D'Auteuil, T. D. Wehrly, B. B. Woodman, L. Davidson, J. Chen, and F. W. Alt. 2000. "Mechanisms That Direct Ordered Assembly of T Cell Receptor Beta Locus V, D, and J Gene Segments." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (14): 7975–80. https://doi.org/10.1073/pnas.130190597.

Smith, Mitchell R. 2003. "Rituximab (Monoclonal Anti-CD20 Antibody): Mechanisms of Action and Resistance." *Oncogene* 22 (47): 7359–68. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206939.

Smith, Sean M., and Wylie W. Vale. 2006. "The Role of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Neuroendocrine Responses to Stress." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 8 (4): 383–95.

Soldevila, Gloria, Ileana Licona, Alfonso Salgado, Marcela Ramirez, Ramses Chavez, and Eduardo Garcia-Zepeda. 2004. "Impaired Chemokine-Induced Migration during T-Cell Development in the Absence of Jak 3." *Immunology* 112 (2): 191–200. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01863.x.

Sonnenfeld, G. 2003. "Animal Models for the Study of the Effects of Spaceflight on the Immune System." *Advances in Space Research* 32 (8): 1473–76. https://doi.org/10.1016/S0273-1177(03)90383-8.

Sonnenfeld, G., E. R. Morey, J. A. Williams, and A. D. Mandel. 1982. "Effect of a Simulated Weightlessness Model on the Production of Rat Interferon." *Journal of Interferon Research* 2 (4): 467–70.

Sonnenfeld, Gerald. 2005. "Use of Animal Models for Space Flight Physiology Studies, with Special Focus on the Immune System." *Gravitational and Space Biology Bulletin: Publication of the American Society for Gravitational and Space Biology* 18 (2): 31–35.

Sonnenfeld, Gerald, Janet S. Butel, and William T. Shearer. 2003. "Effects of the Space Flight Environment on the Immune System." *Reviews on Environmental Health* 18 (1): 1–18. https://doi.org/10.1515/REVEH.2003.18.1.1.

Spivakov, Mikhail, and Amanda G. Fisher. 2007. "Epigenetic Signatures of Stem-Cell Identity." *Nature Reviews Genetics* 8 (4): 263–71. https://doi.org/10.1038/nrg2046.

Srivastava, Santosh K., and Harlan S. Robins. 2012. "Palindromic Nucleotide Analysis in Human T Cell Receptor Rearrangements." *PloS One* 7 (12): e52250. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052250.

Stahn, Alexander C., Andreas Werner, Oliver Opatz, Martina A. Maggioni, Mathias Steinach, Victoria Weller von Ahlefeld, Alan Moore, et al. 2017. "Increased Core Body Temperature in Astronauts during Long-Duration Space Missions." *Scientific Reports* 7 (1): 16180. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15560-w.

Starr, Timothy K., Stephen C. Jameson, and Kristin A. Hogquist. 2003. "Positive and Negative Selection of T Cells." *Annual Review of Immunology* 21: 139–76. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107.

Steffen, J. M., and X. J. Musacchia. 1986. "Thymic Involution in the Suspended Rat: Adrenal Hypertrophy and Glucocorticoid Receptor Content." *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 57 (2): 162–67.

Stevens, S. K., I. L. Weissman, and E. C. Butcher. 1982. "Differences in the Migration of B and T Lymphocytes: Organ-Selective Localization in Vivo and the Role of Lymphocyte-Endothelial Cell Recognition." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 128 (2): 844–51.

Stone, Jennifer D, Daniel T Harris, and David M Kranz. 2015. "TCR Affinity for p/MHC Formed by Tumor Antigens That Are Self-Proteins: Impact on Efficacy and Toxicity." *Current Opinion in Immunology* 33 (April): 16–22. https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.003.

Stowe, Raymond P., Clarence F. Sams, and Duane L. Pierson. 2011. "Adrenocortical and Immune Responses Following Short- and Long-Duration Spaceflight." *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 82 (6): 627–34.

Su, Laura F., and Mark M. Davis. 2013. "Antiviral Memory Phenotype T Cells in Unexposed Adults." *Immunological Reviews* 255 (1): 95–109. https://doi.org/10.1111/imr.12095.

Subrahmanyam, Ramesh, Hansen Du, Irina Ivanova, Tirtha Chakraborty, Yanhong Ji, Yu Zhang, Frederick W Alt, David G Schatz, and Ranjan Sen. 2012. "Localized Epigenetic Changes Induced by DH Recombination Restricts Recombinase to DJH Junctions." *Nature Immunology* 13 (12): 1205–12. https://doi.org/10.1038/ni.2447.

Suedfeld, Peter, Janet E. Halliwell, A. Dennis Rank, and Nicole D. Buckley. 2016. "Psychosocial Aspects of Spaceflight and Aging." *REACH* 2–4 (December): 24–29. https://doi.org/10.1016/j.reach.2016.11.001.

Suresh, R., and D. M. Mosser. 2013. "Pattern Recognition Receptors in Innate Immunity, Host Defense, and Immunopathology." *AJP: Advances in Physiology Education* 37 (4): 284–91. https://doi.org/10.1152/advan.00058.2013.

Szuster-Ciesielska, Agnieszka, Maria Słotwińska, Anna Stachura, Halina Marmurowska-Michałowska, Halina Dubas-Ślemp, Agnieszka Bojarska-Junak, and Martyna Kandefer-Szerszeń. 2008. "Accelerated Apoptosis of Blood Leukocytes and Oxidative Stress in Blood of Patients with Major Depression." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32 (3): 686–94. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.11.012.

Takemura, Y., S. Kikuchi, and Y. Inaba. 1999. "Does Psychological Stress Improve Physical Performance?" *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 187 (2): 111–20.

Tan, Chibing, Ashlee A. Taylor, Matthew Z. Coburn, Julie H. Marino, C. Justin Van De Wiele, and T. Kent Teague. 2011. "Ten-Color Flow Cytometry Reveals Distinct Patterns of Expression of CD124 and CD126 by Developing Thymocytes." *BMC Immunology* 12 (June): 36. https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-36.

Tavian, Manuela, Katia Biasch, Lidia Sinka, Judith Vallet, and Bruno Peault. 2010. "Embryonic Origin of Human Hematopoiesis." *The International Journal of Developmental Biology* 54 (6–7): 1061–65. https://doi.org/10.1387/ijdb.103097mt.

Tavian, Manuela, and Bruno Péault. 2005. "Embryonic Development of the Human Hematopoietic System." *The International Journal of Developmental Biology* 49 (2–3): 243–50. https://doi.org/10.1387/ijdb.041957mt.

Taylor, Erin, Samir Taoudi, and Alexander Medvinsky. 2010. "Hematopoietic Stem Cell Activity in the Aorta-Gonad-Mesonephros Region Enhances after Mid-Day 11 of Mouse Development." *The International Journal of Developmental Biology* 54 (6–7): 1055–60. https://doi.org/10.1387/ijdb.103152et.

Taylor, G. R., I. Konstantinova, G. Sonnenfeld, and R. Jennings. 1997. “Changes in the Immune System during and after Spaceflight.” *Advances in Space Biology and Medicine* 6: 1–32.

Taylor, Peter William. 2015. “Impact of Space Flight on Bacterial Virulence and Antibiotic Susceptibility.” *Infection and Drug Resistance* 8: 249–62. https://doi.org/10.2147/IDR.S67275.

Teague, T. K., C. Tan, J. H. Marino, B. K. Davis, A. A. Taylor, R. W. Huey, and C. J. Van De Wiele. 2010. “CD28 Expression Redefines Thymocyte Development during the Pre-T to DP Transition.” *International Immunology* 22 (5): 387–97. https://doi.org/10.1093/intimm/dxq020.

Tedder, T. F., L. J. Zhou, and P. Engel. 1994. “The CD19/CD21 Signal Transduction Complex of B Lymphocytes.” *Immunology Today* 15 (9): 437–42. https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90274-7.

Thirsk, Robert, Andre Kuipers, Chiaki Mukai, and David Williams. 2009. “The Space-Flight Environment: The International Space Station and Beyond.” *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l’Association Medicale Canadienne* 180 (12): 1216–20. https://doi.org/10.1503/cmaj.081125.

ThyagaRajan, Srinivasan, and Hannah P. Priyanka. 2012. “Bidirectional Communication between the Neuroendocrine System and the Immune System: Relevance to Health and Diseases.” *Annals of Neurosciences* 19 (1): 40–46. https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.180410.

Tiegs, S. L., D. M. Russell, and D. Nemazee. 1993. “Receptor Editing in Self-Reactive Bone Marrow B Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 177 (4): 1009–20.

Tomita, K., M. Hattori, E. Nakamura, S. Nakanishi, N. Minato, and R. Kageyama. 1999. “The BHLH Gene Hes1 Is Essential for Expansion of Early T Cell Precursors.” *Genes & Development* 13 (9): 1203–10.

Tonegawa, S. 1983. “Somatic Generation of Antibody Diversity.” *Nature* 302 (5909): 575–81.

Topham, Nicola J., and Eric W. Hewitt. 2009. “Natural Killer Cell Cytotoxicity: How Do They Pull the Trigger?” *Immunology* 128 (1): 7–15. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03123.x.

Tournefier, A., V. Laurens, C. Chapusot, P. Ducoroy, M. R. Padros, F. Salvadori, and B. Sammut. 1998. “Structure of MHC Class I and Class II CDNAs and Possible Immunodeficiency Linked to Class II Expression in the Mexican Axolotl.” *Immunological Reviews* 166 (December): 259–77.

Trampont, Paul C., Annie-Carole Tosello-Trampont, Yuelei Shen, Amanda K. Duley, Ann E. Sutherland, Timothy P. Bender, Dan R. Littman, and Kodi S. Ravichandran. 2010. “CXCR4 Acts as a Costimulator during Thymic Beta-Selection.” *Nature Immunology* 11 (2): 162–70. https://doi.org/10.1038/ni.1830.

Trinchieri, G., M. Kubin, G. Bellone, and M. A. Cassatella. 1993. “Cytokine Cross-Talk between Phagocytic Cells and Lymphocytes: Relevance for Differentiation/Activation of Phagocytic Cells and Regulation of Adaptive Immunity.” *Journal of Cellular Biochemistry* 53 (4): 301–8. https://doi.org/10.1002/jcb.240530406.

Tronche, C., C. Piérard, M. Coutan, F. Chauveau, P. Liscia, and D. Béracochéa. 2010. “Increased Stress-Induced Intra-Hippocampus Corticosterone Rise Associated with Memory Impairments in Middle-Aged Mice.” *Neurobiology of Learning and Memory* 93 (3): 343–51. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.11.009.

Trück, Johannes, Maheshi N. Ramasamy, Jacob D. Galson, Richard Rance, Julian Parkhill, Gerton Lunter, Andrew J. Pollard, and Dominic F. Kelly. 2015. “Identification of Antigen-Specific B Cell Receptor Sequences Using Public Repertoire Analysis.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (1): 252–61. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401405.

Tsukamoto, Kazumasa, and Kazuhiko Machida. 2014. “Effects of Psychological Stress on Neutrophil Phagocytosis and Bactericidal Activity in Humans — a Meta-Analysis.” *International Journal of Psychophysiology* 91 (2): 67–72. https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2013.12.001.

Turner, Vivian M., and Neil A. Mabbott. 2017. “Ageing Adversely Affects the Migration and Function of Marginal Zone B Cells.” *Immunology* 151 (3): 349–62. https://doi.org/10.1111/imm.12737.

Turvey, Stuart E., and David H. Broide. 2010. “Innate Immunity.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2): S24–32. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016.

Ucar, Duygu, and Bérénice A. Benayoun. 2018. “Aging Epigenetics.” In *Epigenetics of Aging and Longevity*, 3–32. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811060-7.00001-2.

Ueno, Tomoo, Fumi Saito, Daniel H. D. Gray, Sachiyo Kuse, Kunio Hieshima, Hideki Nakano, Terutaka Kakiuchi, Martin Lipp, Richard L. Boyd, and Yousuke Takahama. 2004. “CCR7 Signals Are Essential for Cortex-Medulla Migration of Developing Thymocytes.” *The Journal of Experimental Medicine* 200 (4): 493–505. https://doi.org/10.1084/jem.20040643.

Vallabhapurapu, Sivakumar, and Michael Karin. 2009. “Regulation and Function of NF-KappaB Transcription Factors in the Immune System.” *Annual Review of Immunology* 27: 693–733. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132641.

Van de Walle, Inge, Anne-Catherine Dolens, Kaat Durinck, Katrien De Mulder, Wouter Van Loocke, Sagar Damle, Els Waegemans, et al. 2016. “GATA3 Induces Human T-Cell Commitment by Restraining Notch Activity and Repressing NK-Cell Fate.” *Nature Communications* 7 (April): 11171. https://doi.org/10.1038/ncomms11171.

Verburg-Van Kemenade, B.M.L., B. Nowak, M.Y. Engelsma, and F.A.A. Weyts. 1999. “Differential Effects of Cortisol on Apoptosis and Proliferation of Carp B-Lymphocytes from Head Kidney, Spleen and Blood.” *Fish & Shellfish Immunology* 9 (5): 405–15. https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0197.

Verma, Rohit, Yatan Pal Singh Balhara, and Chandra Shekhar Gupta. 2011. “Gender Differences in Stress Response: Role of Developmental and Biological Determinants.” *Industrial Psychiatry Journal* 20 (1): 4–10. https://doi.org/10.4103/0972-6748.98407.

Vétillard, Mathias, and Géraldine Schlecht-Louf. 2018. “Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper: Fine-Tuning of Dendritic Cells Function.” *Frontiers in Immunology* 9: 1232. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01232.

Vettermann, C., K. Herrmann, C. Albert, E. Roth, M. R. Bosl, and H.-M. Jack. 2008. “A Unique Role for the 5 Nonimmunoglobulin Tail in Early B Lymphocyte Development.” *The Journal of Immunology* 181 (5): 3232–42. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3232.

Vettermann, Christian, and Mark S. Schlissel. 2010. “Allelic Exclusion of Immunoglobulin Genes: Models and Mechanisms.” *Immunological Reviews* 237 (1): 22–42. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00935.x.

Viau, V., S. Sharma, P. M. Plotsky, and M. J. Meaney. 1993. “Increased Plasma ACTH Responses to Stress in Nonhandled Compared with Handled Rats Require Basal Levels of Corticosterone and Are Associated with Increased Levels of ACTH Secretagogues in the Median Eminence.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 13 (3): 1097–1105.

Viswanathan, Kavitha, Christine Daugherty, and Firdaus S. Dhabhar. 2005. “Stress as an Endogenous Adjuvant: Augmentation of the Immunization Phase of Cell-Mediated Immunity.” *International Immunology* 17 (8): 1059–69. https://doi.org/10.1093/intimm/dxh286.

Voss, E. W. 1984. “Prolonged Weightlessness and Humoral Immunity.” *Science (New York, N.Y.)* 225 (4658): 214–15.

Vroom, T. M., G. Scholte, F. Ossendorp, and J. Borst. 1991. “Tissue Distribution of Human Gamma Delta T Cells: No Evidence for General Epithelial Tropism.” *Journal of Clinical Pathology* 44 (12): 1012–17.

Vugmeyster, Y., R. Glas, B. Pérarnau, F. A. Lemonnier, H. Eisen, and H. Ploegh. 1998. “Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I KbDb -/- Deficient Mice Possess Functional CD8+ T Cells and Natural Killer Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (21): 12492–97.

Wagner, David H. 2007. “Re-Shaping the T Cell Repertoire: TCR Editing and TCR Revision for Good and for Bad.” *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 123 (1): 1–6. https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.08.006.

Walshe, Claire A., Stephen A. Beers, Ruth R. French, Claude H. T. Chan, Peter W. Johnson, Graham K. Packham, Martin J. Glennie, and Mark S. Cragg. 2008. “Induction of Cytosolic Calcium Flux by

CD20 Is Dependent upon B Cell Antigen Receptor Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (25): 16971–84. https://doi.org/10.1074/jbc.M708459200.

Walther, Isabelle, Proto Pippia, Maria Antonia Meloni, Franco Turrini, Franca Mannu, and Augusto Cogoli. 1998. "Simulated Microgravity Inhibits the Genetic Expression of Interleukin-2 and Its Receptor in Mitogen-Activated T Lymphocytes." *FEBS Letters* 436 (1): 115–18. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01107-7.

Wang, Baomei, Tina M. Primeau, Nancy Myers, Henry W. Rohrs, Michael L. Gross, Lonnie Lybarger, Ted H. Hansen, and Janet M. Connolly. 2009. "A Single Peptide-MHC Complex Positively Selects a Diverse and Specific CD8 T Cell Repertoire." *Science (New York, N.Y.)* 326 (5954): 871–74. https://doi.org/10.1126/science.1177627.

Wang, J. H., A. Nichogiannopoulou, L. Wu, L. Sun, A. H. Sharpe, M. Bigby, and K. Georgopoulos. 1996. "Selective Defects in the Development of the Fetal and Adult Lymphoid System in Mice with an Ikaros Null Mutation." *Immunity* 5 (6): 537–49.

Wang, J.-C., M. K. Derynck, D. F. Nonaka, D. B. Khodabakhsh, C. Haqq, and K. R. Yamamoto. 2004. "From The Cover: Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Scanning Identifies Primary Glucocorticoid Receptor Target Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (44): 15603–8. https://doi.org/10.1073/pnas.0407008101.

Wang, Leo D., and Marcus R. Clark. 2003. "B-Cell Antigen-Receptor Signalling in Lymphocyte Development." *Immunology* 110 (4): 411–20. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2003.01756.x.

Wang, X., and B. D. Stollar. 1999. "Immunoglobulin VH Gene Expression in Human Aging." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 93 (2): 132–42. https://doi.org/10.1006/clim.1999.4781.

Wang, Yufei, Durdana Rahman, Mukesh Mistry, and Thomas Lehner. 2016. "The Effect of Cellular Stress on T and B Cell Memory Pathways in Immunized and Unimmunized BALB/c Mice." *The Journal of Biological Chemistry* 291 (39): 20707–17. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.746057.

Weber, P. S., S. A. Madsen, G. W. Smith, J. J. Ireland, and J. L. Burton. 2001. "Pre-Translational Regulation of Neutrophil L-Selectin in Glucocorticoid-Challenged Cattle." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 83 (3–4): 213–40.

Wei, Li Xin, Jian Nian Zhou, Arthur I Roberts, and Yu Fang Shi. 2003. "Lymphocyte Reduction Induced by Hindlimb Unloading: Distinct Mechanisms in the Spleen and Thymus." *Cell Research* 13 (6): 465–71. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290189.

Wei, Xing-Cheng, Hiroyuki Kishi, Zhe-Xiong Jin, Wen-Pu Zhao, Sachiko Kondo, Tadashi Matsuda, Shigeru Saito, and Atsushi Muraguchi. 2002. "Characterization of Chromatin Structure and Enhancer Elements for Murine Recombination Activating Gene-2." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (2): 873–81.

Weiser, M. J., C. Osterlund, and R. L. Spencer. 2011. "Inhibitory Effects of Corticosterone in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus (PVN) on Stress-Induced Adrenocorticotrophic Hormone Secretion and Gene Expression in the PVN and Anterior Pituitary: Direct Short-Term Glucocorticoid Negative-Feedback." *Journal of Neuroendocrinology* 23 (12): 1231–40. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02217.x.

Weiskopf, Daniela, Birgit Weinberger, and Beatrix Grubeck-Loebenstein. 2009. "The Aging of the Immune System." *Transplant International* 22 (11): 1041–50. https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x.

Weiss, P. A., S. D. Collier, and S. B. Pruett. 1996. "Role of Glucocorticoids in Ethanol-Induced Decreases in Expression of MHC Class II Molecules on B Cells and Selective Decreases in Spleen Cell Number." *Toxicology and Applied Pharmacology* 139 (1): 153–62. https://doi.org/10.1006/taap.1996.0154.

Wenisch, C., S. Patruta, F. Daxböck, R. Krause, and W. Hörl. 2000. "Effect of Age on Human Neutrophil Function." *Journal of Leukocyte Biology* 67 (1): 40–45.

Weyand, Cornelia M., and Jörg J. Goronzy. 2016. “Aging of the Immune System. Mechanisms and Therapeutic Targets.” *Annals of the American Thoracic Society* 13 (Supplement_5): S422–28. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201602-095AW.

Williams, David, Andre Kuipers, Chiaki Mukai, and Robert Thirsk. 2009. “Acclimation during Space Flight: Effects on Human Physiology.” *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l’Association Medicale Canadienne* 180 (13): 1317–23. https://doi.org/10.1503/cmaj.090628.

Wilson, A., H. R. MacDonald, and F. Radtke. 2001. “Notch 1-Deficient Common Lymphoid Precursors Adopt a B Cell Fate in the Thymus.” *The Journal of Experimental Medicine* 194 (7): 1003–12.

Wilson, J. W., C. M. Ott, K. H. zu Bentrup, R. Ramamurthy, L. Quick, S. Porwollik, P. Cheng, et al. 2007. “Space Flight Alters Bacterial Gene Expression and Virulence and Reveals a Role for Global Regulator Hfq.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (41): 16299–304. https://doi.org/10.1073/pnas.0707155104.

Wilson, James W., C. Mark Ott, Laura Quick, Richard Davis, Kerstin Höner zu Bentrup, Aurélie Crabbé, Emily Richter, et al. 2008. “Media Ion Composition Controls Regulatory and Virulence Response of Salmonella in Spaceflight.” Edited by Frederick M. Ausubel. *PLoS ONE* 3 (12): e3923. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003923.

Woods, Chris C., Krista E. Banks, Raphael Gruener, and Dominick DeLuca. 2003. “Loss of T Cell Precursors after Spaceflight and Exposure to Vector-Averaged Gravity.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (11): 1526–28. https://doi.org/10.1096/fj.02-0749fje.

Wooldridge, Linda, Julia Ekeruche-Makinde, Hugo A. van den Berg, Anna Skowera, John J. Miles, Mai Ping Tan, Garry Dolton, et al. 2012. “A Single Autoimmune T Cell Receptor Recognizes More Than a Million Different Peptides.” *Journal of Biological Chemistry* 287 (2): 1168–77. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289488.

Wortsman, Jacobo. 2002. “Role of Epinephrine in Acute Stress.” *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 31 (1): 79–106.

Wu, Li, and Ken Shortman. 2005. “Heterogeneity of Thymic Dendritic Cells.” *Seminars in Immunology* 17 (4): 304–12. https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.05.001.

Wucherpfennig, K. W., E. Gagnon, M. J. Call, E. S. Huseby, and M. E. Call. 2010. “Structural Biology of the T-Cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (4): a005140–a005140. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005140.

Wyrwoll, Caitlin S., Megan C. Holmes, and Jonathan R. Seckl. 2011. “11β-Hydroxysteroid Dehydrogenases and the Brain: From Zero to Hero, a Decade of Progress.” *Frontiers in Neuroendocrinology* 32 (3): 265–86. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.12.001.

Xing, Y., and K. A. Hogquist. 2012. “T-Cell Tolerance: Central and Peripheral.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (6): a006957–a006957. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006957.

Xu, Cheng-Ran, Lana Schaffer, Steven R. Head, and Ann J. Feeney. 2008. “Reciprocal Patterns of Methylation of H3K36 and H3K27 on Proximal vs. Distal IgVH Genes Are Modulated by IL-7 and Pax5.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (25): 8685–90. https://doi.org/10.1073/pnas.0711758105.

Xu, Y., L. Davidson, F. W. Alt, and D. Baltimore. 1996. “Function of the Pre-T-Cell Receptor Alpha Chain in T-Cell Development and Allelic Exclusion at the T-Cell Receptor Beta Locus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (5): 2169–73.

Yamasaki, Sho, and Takashi Saito. 2007. “Molecular Basis for Pre-TCR-Mediated Autonomous Signaling.” *Trends in Immunology* 28 (1): 39–43. https://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.006.

Yang, Qi, J. Jeremiah Bell, and Avinash Bhandoola. 2010. “T-Cell Lineage Determination: T-Cell Fate Specification and Commitment.” *Immunological Reviews* 238 (1): 12–22. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00956.x.

Yates, Andrew J. 2014. “Theories and Quantification of Thymic Selection.” *Frontiers in Immunology* 5: 13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00013.

Young, Erin E., Elisabeth G. Vichaya, Nicole M. Reusser, Jennifer L. Cook, Andrew J. Steelman, C. Jane R. Welsh, and Mary W. Meagher. 2013. “Chronic Social Stress Impairs Virus Specific Adaptive Immunity during Acute Theiler’s Virus Infection.” *Journal of Neuroimmunology* 254 (1–2): 19–27. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.08.014.

Yu, Qing, Jung-Hyun Park, Loretta L. Doan, Batu Erman, Lionel Feigenbaum, and Alfred Singer. 2006. “Cytokine Signal Transduction Is Suppressed in Preselection Double-Positive Thymocytes and Restored by Positive Selection.” *The Journal of Experimental Medicine* 203 (1): 165–75. https://doi.org/10.1084/jem.20051836.

Zarrow, M. X., J. E. Philpott, and V. H. Denenberg. 1970. “Passage of 14C-4-Corticosterone from the Rat Mother to the Foetus and Neonate.” *Nature* 226 (5250): 1058–59.

Zhang, Min, Gopesh Srivastava, and Liwei Lu. 2004. “The Pre-B Cell Receptor and Its Function during B Cell Development.” *Cellular & Molecular Immunology* 1 (2): 89–94.

Zhang, Yang. 2008. “I-TASSER Server for Protein 3D Structure Prediction.” *BMC Bioinformatics* 9 (January): 40. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40.

Zhang, Yang, Laura Garcia-Ibanez, and Kai-Michael Toellner. 2016. “Regulation of Germinal Center B-Cell Differentiation.” *Immunological Reviews* 270 (1): 8–19. https://doi.org/10.1111/imr.12396.

---

[i] (G. Sonnenfeld et al. 1982; Agrawal and Gupta 2011; Kohno et al. 2012; Murciano et al. 2008; Fleming, Rosenkrans, and Chapes 1990; Wenisch et al. 2000; Fulop et al. 2004; Nomellini et al. 2008; Steffen and Musacchia 1986; Gui et al. 2012; Caren, Mandel, and Nunes 1980; Aw et al. 2016; Turner and Mabbott 2017; Nash 1991; Douziech et al. 2002; Frasca and Blomberg 2009; M. Li et al. 2014; Gavazzi and Krause 2002)

Résumé

Les vols spatiaux sont source de nombreux stress conduisant à un affaiblissement du système immunitaire. L'efficacité de ce système repose notamment sur la diversité des répertoires de récepteurs aux antigènes présents à la surface des lymphocytes B (BCR) et T (TCR) permettant de reconnaitre un grand nombre d'antigènes différents.

Au cours de cette thèse, j'ai étudié la diversité des récepteurs à l'antigène dans trois modèles animaux différents : l'amphibien *Pleurodeles waltl*, le modèle murin de suspension anti-orthostatique (micropesanteur simulée) et le modèle murin CUMS (pour « Chronic Unpredictable Mild Socio-environmental stressors ») qui fait appel à des stress sociaux et environnementaux chroniques similaires à ceux rencontrés lors des vols spatiaux.

L'étude des répertoires de chaînes lourdes d'anticorps IgM et IgY de *P. waltl* a montré que ceux-ci présentent une diversité importante, faisant de cet animal un bon modèle pour étudier les effets d'un vol spatial sur le système immunitaire humoral.

Nous avons aussi montré que l'exposition à la suspension anti-orthostatique durant 21 jours diminue la lymphopoïèse B mais n'affecte que modérément la diversité du répertoire de chaînes lourdes d'IgM. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec des souris âgées afin de savoir si la suspension anti-orthostatique induit un vieillissement accéléré du système immunitaire. Même si nous avons noté des similitudes intéressantes entre ces deux groupes de souris, nous avons constaté que l'effet du vieillissement sur le répertoire d'IgM est plus important que celui de la suspension anti-orthostatique, suggérant que le temps d'exposition au modèle anti-orthostatique devrait être augmenté pour accentuer ses effets sur le répertoire d'anticorps.

Quant au modèle CUMS, nous avons montré que son application durant la gestation n'impacte pas la lymphopoïèse T chez les souriceaux nouveau-nés mais affecte 25% de leur répertoire de chaînes lourdes β du TCR. Ces résultats suggèrent que des stress socio-environnementaux chroniques, même de faibles intensités, pourraient modifier les capacités de reconnaissance antigénique de l'hôte.

Mots clés : Répertoires de BCR et TCR ; Lymphopoïèse ; Stress ; Vols spatiaux ; Vieillissement.

Abstract

Spaceflight is a source of various stresses leading to the weakening of the immune system. The efficiency of this system relies, notably, on the diversity of antigen receptor repertoires present on B (BCR) and T (TCR) cells, allowing the recognition of a vast array of antigens.

During this thesis, I studied the diversity of antigen receptors in three different animal models: the amphibian *Pleurodeles waltl*, the murine anti-orthostatic suspension model (simulated microgravity) and the CUMS (for "Chronic Unpredictable Mild Socio-environmental stressors") murine model involving exposure to chronic social and environmental stressors similar to those encountered during spaceflights.

Analyses of *P. waltl* IgM and IgY heavy chain repertoires have shown that they are highly diverse, making this species a nice animal model for studying the effects of spaceflight on the humoral immune system.

We have also shown that 21 days of anti-orthostatic suspension decrease murine B lymphopoiesis and moderately affect IgM heavy chain repertoire diversity. These results were compared with those obtained with old mice to determine if anti-orthostatic suspension induces an accelerated aging of the immune system. Although we noted interesting similarities between these two groups of mice, we found that the effect of aging on IgM repertoire is stronger than that of the anti-orthostatic suspension, suggesting that anti-orthostatic duration should be extended to increase the effects of this model on antibody repertoire.

Finally, regarding the CUMS model, we have shown that, when applied during gestation it does not affect T lymphopoiesis in newborn mice but affects 25% of their TCRβ heavy chain repertoire. These results suggest that low-intensity chronic socio-environmental stressors may alter antigen recognition capabilities of the host.

Keywords: BCR and TCR repertoires; Lymphopoiesis; Stress; Spaceflight; Ageing.