



**HAL**  
open science

# Effets de stress associés aux vols spatiaux sur le système du complément et les cellules dendritiques

Jérémy Jeandel

► **To cite this version:**

Jérémy Jeandel. Effets de stress associés aux vols spatiaux sur le système du complément et les cellules dendritiques. Immunologie. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0198 . tel-02529109

**HAL Id: tel-02529109**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02529109>**

Submitted on 13 Jan 2022

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto: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.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 **Jérémy JEANDEL**

## Effets de stress associés aux vols spatiaux sur le système du complément et les cellules dendritiques

Soutenue le 09.12.2019

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Jean-Luc BUEB	Professeur des Universités, RU Life Sciences, Université du Luxembourg, Belvaux
	Mme Oumeya ADJALI	Chargée de Recherche INSERM, UMR 1089, Université de Nantes, Nantes
Examineurs :	M. Jean-Pol FRIPPIAT	Professeur des Universités, EA 7300, Université de Lorraine, Nancy (directeur de thèse)
	Mme Sandra KAMINSKI	Maître de conférences, EA 7300, Université de Lorraine, Nancy (co-directeur de thèse)

---

EA 7300 « Stress, Immunité, Pathogènes », Université de Lorraine, Faculté de Médecine, 9 Avenue  
de la Forêt de Haye, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy.

## 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 **Jérémy JEANDEL**

## Effets de stress associés aux vols spatiaux sur le système du complément et les cellules dendritiques

Soutenue le 09.12.2019

### Membres du jury :

<b>Rapporteurs :</b>	<b>M. Jean-Luc BUEB</b>	<b>Professeur des Universités, RU Life Sciences, Université du Luxembourg, Belvaux</b>
	<b>Mme Oumeya ADJALI</b>	<b>Chargée de Recherche INSERM, UMR 1089, Université de Nantes, Nantes</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>M. Jean-Pol FRIPPIAT</b>	<b>Professeur des Universités, EA 7300, Université de Lorraine, Nancy (directeur de thèse)</b>
	<b>Mme Sandra KAMINSKI</b>	<b>Maître de conférences, EA 7300, Université de Lorraine, Nancy (co-directeur de thèse)</b>

---

EA 7300 « Stress, Immunité, Pathogènes », Université de Lorraine, Faculté de Médecine, 9 Avenue  
de la Forêt de Haye, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy.



## REMERCIEMENTS

Pour commencer, je tiens à remercier Mme Grandemange et Claire Barbieux pour leur encadrement durant mon stage de M1 puisque c'est cette expérience qui m'a donné envie de m'orienter vers un M2R suivi d'une thèse.

Personne n'a la science infuse et une thèse ne se réalise pas seul. Ainsi, je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire pour m'avoir aidé durant ces 4 années. Tout d'abord mes maîtres de thèse, Sandra Kaminski et Jean-Pol Frippiat, qui m'ont coaché durant le stage de M2, pour l'oral de l'ED et qui ont accepté de m'encadrer tout au long de ma thèse. J'ai également reçu de l'aide de la part de Nassima, Julianne, Anne-Marie, Lisiane et Julie mais surtout de la part de Stéphanie Ghislín qui m'a aidé à de (très) nombreuses reprises pour les expérimentations ainsi que pour l'analyse des résultats. Merci tout particulièrement pour ta patience face à mes incessantes questions.

J'ai également eu la chance de recevoir de l'aide de la part des thésards du laboratoire, Guillaume Harlé et Coralie Fonte, qui m'ont soutenu à la fois au niveau des manips mais également au niveau du moral. Entre compagnons de galère, on se comprend. Je leur souhaite à tous les deux une bonne continuation en recherche (puisque'ils ont eu le courage de poursuivre en Post-Doc) et j'espère qu'ils atteindront leurs objectifs.

Je voudrais également remercier Armelle Ropars et Christine Legrand-Frossi qui m'ont apporté leur aide plus particulièrement du côté des enseignements à la FST. Je suis heureux d'avoir pu enseigner à la fois en tant que DCE et  $\frac{1}{2}$  ATER puisque cet aspect de ma thèse m'a permis de me rendre compte que je voulais en faire mon métier.

Je n'oublie pas non plus le soutien apporté par les personnes travaillant au niveau des plates formes de microscopie confocale mais également de cytométrie en flux et particulièrement Huguette Louis. Je tiens également à remercier Fred et Pamela ainsi que Frances Yen Potin qui nous ont accueilli dans leur animalerie.

Enfin, je remercie du fond du cœur ma famille et mes amis sans le soutien desquels j'aurais probablement baissé les bras. Je ne m'aventurerais pas à les nommer de peur d'en oublier mais cela ne doit en aucun cas minimiser le rôle central qu'ils ont pu jouer durant ces 4 années et je pense qu'ils se reconnaîtront si, par hasard, ils lisent ces quelques lignes un jour. Merci pour votre patience et votre compréhension lorsque les choses n'allaient pas au mieux ou lorsque je ne pouvais me libérer. Je vous suis reconnaissant pour les innombrables occasions au cours desquelles vous m'avez remonté le moral et je pense sincèrement que je n'y serais tout simplement pas arrivé sans vous.

A vous tous un grand merci, Jérémy



# Table des matières

---

## Introduction

---

I.	Le système immunitaire .....	11
A.	Généralités .....	11
B.	L'immunité naturelle ou innée .....	11
1)	Les barrières physico-chimiques .....	11
2)	Les différents types cellulaires impliqués.....	12
3)	Reconnaissance des pathogènes par les cellules de la RI innée .....	13
4)	Déroulement de la RI innée.....	14
5)	Les facteurs solubles.....	15
6)	Le système du complément .....	16
a)	Les voies d'activation du complément.....	17
i.	La voie classique .....	17
ii.	La voie associée aux lectines .....	18
iii.	La voie alterne .....	18
iv.	La voie finale commune.....	19
b)	Régulation du système du complément.....	21
c)	Evolution du système du complément.....	22
C.	L'immunité adaptative .....	24
1)	Généralités .....	24
2)	Les cellules dendritiques .....	24
a)	Généralités .....	24
b)	Différenciation et phénotype .....	26
c)	Les différentes sous-populations de DC murines.....	27
d)	Différenciation de DC in vitro .....	28
e)	Phénotype d'activation/maturation des DC.....	29
i.	Phénotype immature des DC .....	29
ii.	Phénomènes d'activation/maturation .....	30
iii.	Régulation de la maturation/activation .....	31
f)	Fonctions des cellules dendritiques .....	32
i.	La présentation antigénique .....	32
ii.	Polarisation des LT CD4 <sup>+</sup> .....	33





➤ Polarisation Th1.....	34
➤ Polarisation Th2.....	34
➤ Polarisation Th17.....	35
➤ Polarisation des Treg.....	35
II. Le stress.....	37
A. Définition.....	37
B. La réponse au stress : le syndrome général d'adaptation.....	38
1) Stress aigu et chronique : la phase d'alarme.....	38
2) Stress chronique : les phases de résistance et d'épuisement.....	39
C. L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien.....	39
1) Activation de l'axe HHS.....	39
2) Fonctionnement de l'axe HHS.....	40
3) Régulation de l'axe HHS.....	41
4) Dérégulation de l'axe HHS par le stress chronique.....	41
D. Stress rencontrés lors de vols spatiaux.....	42
1) Radiations.....	42
2) Socio-environnementaux.....	44
a) Modèles d'étude chez l'Homme.....	45
b) Modèle d'étude chez la souris : Le CUMS.....	46
3) Les changements de gravité.....	48
a) Les modèles de simulation de la microgravité simulée au niveau cellulaire.....	49
i. Les tours d'impesanteur et les fusées-sondes.....	49
ii. La lévitation magnétique.....	49
iii. Les clinostats.....	50
➤ Fonctionnement et terminologie.....	50
➤ La Random Positioning Machine (RPM).....	50
b) Les modèles de simulation de la microgravité au niveau de l'organisme entier.....	51
i. Le vol parabolique : un modèle d'étude simulant la microgravité.....	51
ii. Les modèles d'étude simulant les effets de la microgravité.....	52
➤ Chez l'Homme : Le modèle d'alitement prolongé « Bed rest ».....	52
➤ Chez le rongeur : Le modèle HU.....	54
III. Effets du stress et des vols spatiaux sur le SI.....	55
A. Généralités.....	55
B. Effets du stress sur le SI.....	56



1) Modulation des effets du stress selon sa durée .....	56
a) Impact du stress aigu sur le SI .....	57
b) Impact du stress chronique sur le SI.....	58
2) Effets des hormones de stress sur les cellules du SI .....	59
a) Généralités .....	59
b) Impact des hormones de stress sur les DC.....	60
C. Impact des vols spatiaux sur le SI.....	61
1) Généralités .....	61
2) Effet des différents types de stress rencontrés lors des vols spatiaux .....	62
a) Les radiations.....	63
b) Les stress socio-environnementaux .....	64
c) Les changements de gravité .....	65
i. L'hypergravité.....	65
ii. La microgravité.....	67
➤ Effets de la microgravité sur les bactéries.....	67
➤ Effets de la microgravité sur le SI .....	68
✓ Généralités .....	68
✓ Effets de la microgravité sur les DC.....	69

## Objectifs du projet

---

Objectif 1 : Etude des effets de différents types de stress, rencontrés en vol et simulés en laboratoire, sur la production de la molécule C3 du complément. ....	71
Objectif 2 : Etude des effets du stress sur les cellules dendritiques murines.....	72

## Matériel et Méthodes

---

I. Animaux.....	74
II. Mise à mort .....	74
III. Culture cellulaire .....	74
A. Différenciation des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (BMDC).....	74
B. Purification cellulaire.....	75
1) Purification des cellules dendritiques (DC) spléniques .....	75
2) Purification des LT CD4 <sup>+</sup> OT-II naïfs .....	76
IV. Exposition aux différents modèles de stress.....	76
A. Exposition à la microgravité simulée.....	76
B. Exposition à des sérums de souris ayant subi différents types de stress .....	77



1) Modèle de stress socio-environnemental CUMS.....	77
2) Stress hypergravitaire.....	78
a) Modèle de stress hypergravitaire chronique .....	78
b) Modèle de stress hypergravitaire aigu.....	78
V. Dosage de la corticostérone sérique (ELISA).....	78
VI. Criblage des cytokines par cytokine array.....	79
VII. RT-qPCR.....	80
VIII. Présentation antigénique et marquage de LFA-1 par immunofluorescence .....	81
IX. Cytométrie en flux.....	82
A. Phénotypage des DC spléniques et BMDC.....	82
B. F-actin.....	82
C. Mesure de l'apoptose.....	82
X. Analyses statistiques .....	83

## Résultats

---

I. Effets de différents types de stress, rencontrés en vol et simulés en laboratoire, sur la molécule C3 du complément. ....	84
A. INTRODUCTION .....	84
B. RESULTATS ET DISCUSSION .....	86
1) Effets des stress sur la transcription de C3 chez <i>P. waltl</i> .....	86
2) Effets de deux combinaisons de stress sur l'expression de C3 chez <i>P. waltl</i> .....	86
3) Effet de stress liés aux vols spatiaux sur l'expression de C3 chez la souris.....	87
C. DISCUSSION .....	88
D. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	90
II. Etude des effets de la microgravité simulée par RPM sur le phénotype et la fonction des cellules dendritiques .....	92
A. Exposition des DC spléniques à des sérums de souris ayant subi un stress de type socio-environnemental ou mécanique .....	92
1) Effets sur le phénotype d'activation/maturation des DC.....	92
2) Etude des facteurs sériques présents dans les sérums de souris soumises à différents types de stress.....	93
a) Dosage de la corticostérone sérique.....	93
b) Criblage des cytokines présentes dans les sérums de souris exposées au stress hypergravitaire .....	94
B. Effets d'un stress microgravitaire sur les DC.....	95
1) Effets de la microgravité simulée sur le cytosquelette et l'apoptose des DC.....	96



a)	Impact de la RPM sur le cytosquelette d'actine des DC.....	96
b)	Impact de la RPM sur la survie des DC. ....	96
i.	Etude de l'apoptose des BMDC et DC spléniques .....	96
ii.	Impact d'une variation de la concentration cellulaire sur la viabilité des BMDC.....	97
2)	Impact du stress microgravitaire sur le phénotype d'activation/ maturation des DC.....	98
a)	Effets du stress microgravitaire sur les BMDC .....	98
b)	Effets du stress microgravitaire sur les DC spléniques.....	100
i.	Expression des marqueurs d'activation/maturation des DC spléniques .....	100
ii.	Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires .....	100
iii.	Impact de la microgravité simulée par RPM sur la quantité de transcrits des marqueurs d'activation/maturation des DC.....	101
➤	Dans les BMDC.....	101
➤	Dans les DC spléniques .....	102
3)	Effet du stress microgravitaire sur la fonction de présentation antigénique des DC spléniques.....	103
4)	Conclusion Générale.....	104

## Discussion et Perspectives

---

III.	Discussion et perspectives .....	107
A.	Etude des effets du stress sur les cellules dendritiques murines.....	107
1.	Effets de différents types de stress sur les DC spléniques .....	107
2.	Effets d'un stress microgravitaire sur les DC.....	109
a)	Effets de la microgravité simulée sur le cytosquelette et l'apoptose des DC.....	109
b)	Impact du stress microgravitaire sur le phénotype d'activation/ maturation des DC....	111
c)	Effet du stress microgravitaire sur la fonction de présentation antigénique des DC spléniques.....	114

## Annexes

---

ANNEXE 1 :	Publication.....	118
ANNEXE 2 :	Modifications de la gravité et développement des cellules immunitaires.....	119
ANNEXE 3 :	Modifications du système immunitaire associées aux vols spatiaux.....	121

## Références

---

IV.	Références.....	124
-----	-----------------	-----





## Liste des abréviations

---

<b>11β-HSD</b>	<b>11 bêta HydroxyStéroïde Déshydrogénases</b>
<b>2D</b>	<b>2 Dimensions</b>
<b>3D</b>	<b>3 Dimensions</b>
<b>7AAD</b>	<b>7-AminoActinomycine D</b>
<b>A</b>	<b>Adénine (base ADN)</b>
<b>Ac</b>	<b>Anticorps</b>
<b>ACTH</b>	<b>Adreno CorticoTrophic Hormone (Hormone corticotrope)</b>
<b>ADN</b>	<b>Acide DésoxyriboNucléique</b>
<b>ADNc</b>	<b>ADN complémentaire</b>
<b>ADNg</b>	<b>ADN génomique</b>
<b>Ag</b>	<b>Antigène</b>
<b>ANACT</b>	<b>Agence Nationale pour l'Amélioration des Conditions de Travail</b>
<b>ANOVA</b>	<b>ANalysis Of VAriance (Analyse de variance)</b>
<b>Anx V</b>	<b>Annexine V</b>
<b>APC</b>	<b>AlloPhycoCyanine</b>
<b>ARN</b>	<b>Acide RiboNucléique</b>
<b>ARNm</b>	<b>ARN messenger</b>
<b>BLAST</b>	<b>Basic Local Alignment Search Tool ("Outil d'alignement de bases")</b>
<b>BLC</b>	<b>B Lymphocyte Chemoattractant (Chimioattractant de lymphocytes B)</b>
<b>BMcDC</b>	<b>Bone Marrow conventional Dendritic Cells (Cellules dendritiques conventionnelles dérivées de moelle osseuse)</b>
<b>BMDC</b>	<b>Bone Marrow Dendritic Cells (Cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse)</b>
<b>BMpDC</b>	<b>Bone Marrow plasmacytoid Dendritic Cells (Cellules dendritiques plasmacytoïdes)</b>
<b>BSA</b>	<b>Bovine Serum Albumin (Albumine de sérum bovin)</b>
<b>C</b>	<b>Cytosine (base ADN)</b>
<b>C4BP</b>	<b>C4b-Binding Protein (Protéine liant C4b)</b>
<b>C57Bl/6</b>	<b>lignée C57 Black 6 souche J ou N</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster of Differentiation (Groupe de différenciation)</b>
<b>cDC</b>	<b>conventional Dendritic Cells (Cellules dendritiques conventionnelles)</b>
<b>CMH</b>	<b>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</b>
<b>CPA</b>	<b>Cellules Présentatrices de l'Antigène</b>
<b>CR</b>	<b>Complement Receptor (Récepteur du complément)</b>
<b>CRH</b>	<b>Corticotropin-Releasing Hormone (Corticolibérine)</b>
<b>CSA</b>	<b>Consumer Science &amp; Analytics ("Analyse et science du consommateur")</b>
<b>CT</b>	<b>ConTrôle</b>
<b>CTB</b>	<b>Cell Tracker™ Blue (Traqueur cellulaire bleu)</b>
<b>CTL pos</b>	<b>ConTrôle positif</b>
<b>CUMS</b>	<b>Chronic Unpredictable Mild Stress (Stress chronique aléatoire de faible intensité)</b>
<b>CXCL1</b>	<b>C-X-C motif Ligand 1 ("Ligand de chimiokine à motif C-X-C")</b>
<b>DAF</b>	<b>Decay-Accelerating Factor ("Facteur accélérant le déclin")</b>



<b>DAMP</b>	<b>D</b> anger- <b>A</b> ssociated <b>M</b> olecular <b>P</b> attern ("Motifs moléculaires associés au danger")
<b>DC</b>	<b>D</b> endritic <b>C</b> ells (Cellules dendritiques)
<b>dNTPs</b>	<b>d</b> eoxyribo <b>N</b> ucleotide <b>T</b> ri <b>P</b> hosphate (désoxyribonucléotides)
<b>DSNL</b>	<b>D</b> efence and <b>S</b> pace <b>N</b> ether <b>L</b> ands ("Entreprise Hollandaise d'Aérospatiale et de défense")
<b>DTT</b>	<b>D</b> i <b>T</b> hio <b>T</b> hréitol
<b>E. coli</b>	<b>E</b> scherichia coli
<b>e.g.</b>	<b>e</b> xempli <b>g</b> ratia
<b>EDTA</b>	Éthylène <b>D</b> iamine <b>T</b> étra <b>A</b> cétique
<b>Ef1a</b>	<b>E</b> longation <b>f</b> actor <b>1</b> <b>a</b> lpha (Facteur d'élongation 1 alpha)
<b>Eif3f</b>	<b>E</b> ukaryotic translation <b>i</b> nitiation <b>f</b> actor <b>3</b> subunit <b>f</b> (Facteur eucaryote d'initiation de la traduction 3 sous unité f)
<b>ELISA</b>	<b>E</b> nzyme <b>L</b> inked <b>I</b> mmuno <b>S</b> orbent <b>A</b> ssay ("Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée")
<b>EU-OSHA</b>	<b>E</b> uropean <b>U</b> nion <b>O</b> ccupational <b>S</b> afety and <b>H</b> ealth <b>A</b> dministration (Agence européenne pour la sécurité et la santé au travail)
<b>ex.</b>	<b>e</b> xemple
<b>FACS</b>	<b>F</b> luorescence- <b>A</b> ctivated <b>C</b> ell <b>S</b> orting (Cytométrie en flux)
<b>F-actin</b>	<b>F</b> ibrous-actin (Actine fibrillaire )
<b>Fc</b>	<b>F</b> ragment <b>c</b> ristallisable
<b>FDC</b>	<b>F</b> ollicular <b>D</b> endritic <b>C</b> ells (Cellules dendritiques folliculaires)
<b>FITC</b>	<b>F</b> luorescein <b>I</b> so <b>T</b> hio <b>C</b> yanate (Isothiocyanate de fluorescéine)
<b>FIt3L</b>	<b>F</b> ibromyalgia syndrome-like <b>t</b> yrosine <b>k</b> inase <b>3</b> <b>L</b> igand ("Ligand de la tyrosine kinase 3 de type syndrome de la fibromyalgie")
<b>FR 3209</b>	<b>F</b> édération de <b>R</b> echerche 3209
<b>G</b>	<b>G</b> uanine (base ADN)
<b>GC</b>	<b>G</b> luco <b>C</b> orticoïdes
<b>GM-CSF</b>	<b>G</b> ranulocyte- <b>M</b> acrophage <b>C</b> olony- <b>S</b> timulating <b>F</b> actor ("Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages")
<b>GR</b>	<b>G</b> lucocorticoid <b>R</b> eceptor (Récepteur aux glucocorticoïdes)
<b>GRE</b>	<b>G</b> lucocorticoid- <b>R</b> esponse <b>E</b> lement (Elements de réponse aux glucocorticoïdes)
<b>Gusb</b>	<b>G</b> lucuronidase <b>b</b> eta
<b>HAMP</b>	<b>H</b> ost- <b>A</b> ssociated <b>M</b> olecular <b>P</b> atterns (Motifs moléculaires associés à l'hôte)
<b>HEPES</b>	4 - (2 - <b>H</b> ydroxy <b>E</b> thyl) <b>P</b> iperazine – 1 - <b>E</b> thane <b>S</b> ulfonic (Acide [(hydroxyéthyl - 2) – 4 – pipérazinyl - 1] – 2 - éthane sulfonique)
<b>HHS</b>	<b>H</b> ypothalamo- <b>H</b> ypophyso- <b>S</b> urrénalien
<b>HRP</b>	<b>H</b> orse <b>R</b> adish <b>P</b> eroxidase (Peroxydase de raifort)
<b>HU</b>	<b>H</b> ind <b>L</b> imb <b>U</b> nloading (Suspension anti-orthostatique)
<b>hyperG</b>	hyper <b>G</b> ravité
<b>IBSLor</b>	<b>I</b> ngénierie, <b>B</b> iologie, <b>S</b> anté en <b>L</b> orraine
<b>IFN</b>	<b>I</b> nter <b>F</b> éro <b>N</b>
<b>IgG</b>	<b>I</b> mmunoglobulines <b>G</b>
<b>IL</b>	<b>I</b> nter <b>L</b> eukine
<b>IL1-ra</b>	<b>I</b> nter <b>L</b> eukin- <b>1</b> <b>r</b> eceptor <b>a</b> ntagonist (Antagoniste du récepteur de l'interleukine 1)



<b>IP-10</b>	<b>Interferon gamma-induced Protein 10</b> (Protéine 10 induite par l'interféron gamma)
<b>ISS</b>	<b>International Space Station</b> (Station spatiale internationale)
<b>LB</b>	<b>Lymphocyte B</b>
<b>LET</b>	<b>Linear Energy Transfert</b> (Transfert linéique d'énergie)
<b>LFA-1</b>	<b>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</b> (Antigène 1 associé aux fonctions lymphocytaires)
<b>LPS</b>	<b>LipoPolySaccharide</b>
<b>LS</b>	<b>Large Size</b> ("taille large") (colonne)
<b>LT</b>	<b>Lymphocyte T</b>
<b>LTh</b>	<b>LT helper</b> (Lymphocyte T auxiliaire)
<b>LT<sub>reg</sub></b>	<b>LT régulateur</b>
<b>MASP</b>	<b>Mannose-binding protein-Associated Serine Protease</b> ("Sérine protéases associées aux protéines de liaison au mannose")
<b>MBL</b>	<b>Mannose-Binding Lectine</b> ("Lectine se fixant au mannose")
<b>MCP</b>	<b>Membrane Cofactor Protein</b> ("Cofacteur protéique membranaire")
<b>MCP-1</b>	<b>Monocyte Chemoattractant Protein 1</b> (Protéine 1 chimioattractante des monocytes)
<b>M-CSF</b>	<b>Macrophage Colony-Stimulating Factor</b> ("Facteur stimulant les colonies de macrophages")
<b>MIG</b>	<b>Monokine Induced by Gamma interferon</b> (Monokine induite par l'interféron gamma)
<b>MIP</b>	<b>Macrophage Inflammatory Protein</b> ("Protéine inflammatoire des macrophages")
<b>MMLV</b>	<b>Moloney Murine Leukemia Virus</b> (Virus de la leucémie murine de Moloney)
<b>mPDCA1</b>	<b>mouse Plasmacytoid Dendritic Cell Antigen-1</b> (Antigène 1 des cellules dendritiques plasmacytoïdes murines)
<b>MR</b>	<b>Mineralocorticoid Receptor</b> (Recepteurs aux minéralocorticoïdes)
<b>NASA</b>	<b>National Aeronautics and Space Administration</b> (Administration nationale de l'aéronautique et de l'espace)
<b>NCBI</b>	<b>National Center for Biotechnology Information</b> (Centre national pour l'information en biotechnologie)
<b>NEEMO</b>	<b>NASA Extreme Environment Mission Operations</b> ("Programme de mission en environnement extrême de la NASA")
<b>NK</b>	<b>Natural Killer</b> ("tueuses naturelles")
<b>OBT</b>	<b>Orbite Basse Terrestre</b>
<b>OMS</b>	<b>Organisation Mondiale de la Santé</b>
<b>OT-II</b>	<b>Ovalbumin-specific TCR Transgenic line II</b> ("Lignée II transgénique de TCR spécifique à l'ovalbumine")
<b>OVA</b>	<b>OVA</b> lbumine
<b>p</b>	<b>probability</b> (probabilité) (statistique)
<b>P. waltl</b>	<b>Pleurodeles waltl</b>
<b>PAMP</b>	<b>Pathogen-Associated Molecular Pattern</b> (Motifs moléculaires associés aux pathogènes)
<b>PBS</b>	<b>Phosphate-Buffered Saline</b> (Tampon phosphate salin )
<b>PC7</b>	<b>Phycoerythrin-Cyanine 7</b> (Phycoérythrine Cyanine 7)



<b>pDC</b>	<b>plasmacytoid Dendritic Cells</b> (Cellules dendritiques plasmacytoïdes)
<b>PE</b>	<b>PhycoErythrin</b> (Phycoérythrine)
<b>PE-Vio</b>	<b>PhycoErythrin-Viability</b> (Phycoérythrine-"Viabilité")
<b>PFA</b>	<b>ParaFormAldéhyde</b>
<b>Pha</b>	<b>Phalloïdine</b>
<b>PLSD</b>	<b>Partial Least-Squares Difference</b> (Régression par les moindres carrés partiels )
<b>PRR</b>	<b>Pattern Recognition Receptor</b> (Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires)
<b>qPCR</b>	<b>quantitative Polymerase Chain Reaction</b> (Réaction quantitative de polymérisation en chaîne )
<b>RANTES</b>	<b>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</b> ("Chimiokine exprimée et sécrétée par les LT activés")
<b>rDNase</b>	<b>recombinant Dnase</b> ("Enzyme de dégradation de l'ADN recombinée")
<b>RH</b>	<b>Random Hexamers</b> ("hexamères aléatoires")
<b>RI</b>	<b>Réponse Immunitaire</b>
<b>RNA</b>	<b>RiboNucleic Acid</b> (Acide ribonucléique)
<b>RNase</b>	<b>RiboNucléase</b>
<b>ROS</b>	<b>Reactive Oxygen Species</b> (Espèces réactives de l'oxygène)
<b>RPM</b>	<b>Random Positioning Machine</b> ("Dispositif à positionnement aléatoire")
<b>RPMI</b>	<b>Roswell Park Memorial Institute</b> (Institut "Roswell Park Memorial")
<b>RT</b>	<b>Reverse Transcription</b> (Transcription inverse)
<b>RWV</b>	<b>Rotating Wall Vessel</b> ("Bioréacteur rotatif")
<b>SDF-1</b>	<b>Stromal cell-Derived Factor 1</b> (Facteur 1 dérivé des cellules stromales)
<b>SI</b>	<b>Système Immunitaire</b>
<b>sICAM-1</b>	<b>soluble Inter Cellular Adhesion Molecule-1</b> (Molécule 1 soluble d'adhésion intercellulaire)
<b>SN</b>	<b>Système Nerveux</b>
<b>SNC</b>	<b>Système Nerveux Central</b>
<b>SVF</b>	<b>Sérum de Veau Fœtal</b>
<b>T</b>	<b>Thymine</b> (base ADN)
<b>T</b>	<b>Tendance</b> (statistique)
<b>TIMP-1</b>	<b>Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1</b> (Inhibiteur tissulaire 1 de metalloprotéase)
<b>TLR</b>	<b>Toll Like Receptor</b> (Récepteur de type Toll)
<b>TMB</b>	<b>TétraMethylBenzidine</b>
<b>TNF</b>	<b>Tumor Necrosis Factor</b> (Facteur de nécrose tumorale)
<b>Tp</b>	<b>Tampon</b>
<b>TREM-1</b>	<b>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 1</b> ("Récepteur 1 de cellules myéloïdes")
<b>UE</b>	<b>Union Européenne</b>
<b>UMS</b>	<b>Unité Mixte de Service</b>
<b>Vio</b>	<b>Viability</b>
<b>vs</b>	<b>versus</b>
<b>X. laevis</b>	<b>Xenopus laevis</b>





## Liste des symboles

---

<b>%</b>	Pourcentage
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>µg</b>	Microgramme
<b>µL</b>	Microlitre
<b>µM</b>	Micromolaire
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de Carbone
<b>deg/sec</b>	Degrés par seconde
<b>g (accélération)</b>	Accélération de la pesanteur
<b>g (masse)</b>	Gramme
<b>h</b>	Heure
<b>H<sub>2</sub>O up</b>	Eau ultrapure
<b>j</b>	Jour
<b>M</b>	Molaire
<b>m/s<sup>2</sup></b>	Mètre par seconde carré
<b>min</b>	Minute
<b>mL</b>	Millilitre
<b>ng</b>	Nanogramme
<b>rpm (unité)</b>	Rotation par minute
<b>s</b>	Seconde
<b>U (unité)</b>	Activité enzymatique



# INTRODUCTION

---

## I. Le système immunitaire

### A. Généralités

Le système immunitaire (SI) est un système complexe de cellules et de molécules présentes dans tous les compartiments de l'organisme afin d'assurer une défense rapide et efficace de ce dernier contre une multitude de pathogènes. Lorsqu'un pathogène pénètre dans l'organisme, la mise en place d'une réponse immunitaire va permettre de lutter contre les effets délétères de l'infection de manière séquentielle. Dans un premier temps, il y a mise en place de la réponse immunitaire (RI) primaire ou aspécifique caractérisée par des molécules (e.g. complément, cytokines) ainsi que par des cellules immunitaires pouvant avoir différentes actions. Il existe au sein de la RI primaire des cellules phagocytaires comme les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les monocytes ainsi que des cellules cytotoxiques telles que les cellules Natural Killer (NK). La RI primaire est la plus ancienne d'un point de vue évolutif et est ainsi qualifiée d'immunité innée ou ancestrale. Elle n'est pas spécifique du pathogène et peut être insuffisante. Si tel est le cas, lorsque l'infection perdure, la seconde partie de la réponse immunitaire, appelée réponse immunitaire secondaire ou adaptative, va être mise en place. Cette dernière est retrouvée dans tous les organismes depuis les premiers Vertébrés à mâchoire. Elle est donc plus récente d'un point de vue évolutif et se met en place plus tardivement au cours de l'infection car, contrairement à la RI primaire, elle est spécifique à l'agent pathogène. La RI secondaire est composée de la voie classique du complément et de différents types de cellules comme les lymphocytes de type B ou T (LB et LT, respectivement) et les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) dont les plus efficaces sont les cellules dendritiques (DC). Ce dernier exemple, ainsi que les différentes voies du complément, montrent que les réponses immunitaires primaire et secondaire sont composées de nombreuses molécules et cellules agissant en synergie afin de détruire toute menace le plus rapidement et le plus efficacement possible.

### B. L'immunité naturelle ou innée

#### 1) Les barrières physico-chimiques

La toute première ligne de défense de l'organisme face aux pathogènes est composée de la peau et des muqueuses. Ces barrières physiques s'opposent à l'entrée des pathogènes par



leur pH ou leur viscosité, respectivement. En effet, la peau est recouverte d'une couche superficielle de kératinocytes et est caractérisée par un pH acide s'opposant ainsi à l'entrée et à la prolifération des pathogènes. Les muqueuses sécrètent quant à elles du mucus qui va piéger les pathogènes grâce à sa viscosité élevée et ainsi empêcher leur entrée dans l'organisme. Tout comme l'ensemble des compartiments de l'organisme, la peau et les muqueuses contiennent des cellules du SI jouant le rôle de sentinelles. Ces cellules vont être à l'origine de la mise en place de la réponse immunitaire.

## **2) Les différents types cellulaires impliqués**

La réponse immunitaire innée étant la plus ancienne d'un point de vue évolutif, les types cellulaires impliqués sont par conséquent retrouvés dans de nombreux organismes. Nous allons ici décrire ceux qui sont présents chez les mammifères.

La réponse immunitaire innée est constituée de cellules présentes dans tout l'organisme et jouant le rôle de sentinelles afin de détecter et de lutter contre les infections le plus rapidement possible. Ces cellules peuvent par conséquent être résidentes (e.g. macrophages ; tissus) ou circulantes (e.g. monocytes et granulocytes ; sang). L'ensemble de ces cellules vont être capables de reconnaître les pathogènes grâce à différents mécanismes détaillés ci-après.

La principale ligne de défense de la réponse immunitaire non-spécifique est constituée par des cellules capables de phagocyter le pathogène, appelées phagocytes, ou d'éliminer les cellules « dangereuses » (ex : cellules infectées ou en cours de transformation tumorale) comme les cellules NK.

Les principaux phagocytes sont les macrophages [1], qui sont résidents ainsi que les neutrophiles [2] qui sont circulants. Les neutrophiles possèdent des granules intracytoplasmiques aux propriétés microbicides [3] tandis que les monocytes/macrophages possèdent quant à eux des lysosymes [4,5].

Le phagocyte va pouvoir reconnaître et se fixer au pathogène *via* différents mécanismes faisant intervenir l'immunité innée (récepteurs Toll Like, molécule C3 du système du complément) ou adaptative (partie constante des Ac) et que nous développerons ci-après. Après reconnaissance, le phagocyte va émettre des extensions membranaires appelées pseudopodes qui vont englober le pathogène. Ce dernier sera alors inclus dans une vésicule appelée phagosome avec laquelle vont fusionner les granules (neutrophiles) ou les



lysosomes (macrophages) du phagocyte conduisant ainsi à la formation du phagolysosome au sein duquel le pathogène sera éliminé grâce au contenu microbicide des granules/lysosomes.

D'autres types cellulaires sont capables de phagocyter le pathogène mais de manière moins efficace comme par exemple les éosinophiles [6] qui font eux aussi partie de l'immunité innée mais également les cellules dendritiques [7] qui font partie à la fois de l'immunité innée et adaptative. Il est également à noter que les macrophages peuvent se différencier à partir de monocytes [8] et sont capables de présenter l'antigène (Ag) participant ainsi, comme les DC, à la réponse immunitaire adaptative/spécifique.

Les cellules NK vont, quant à elle, être capables de reconnaître et d'éliminer les cellules présentant un danger pour l'organisme telles que les cellules infectées [9] ou en cours de transformation tumorale [10] en provoquant leur lyse.

### **3) Reconnaissance des pathogènes par les cellules de la RI innée**

Ces cellules sont capables de reconnaître les agents pathogènes grâce à des récepteurs de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptor : PRR). Il existe plusieurs types de PRR : les récepteurs de type Toll (Toll Like Receptor : TLR), les récepteurs de type RIG (RIG Like Receptor : RLR), les récepteurs de type Lectine (C-Type Lectin Receptors : CLR) et les récepteurs de type NOD (NOD-Like Receptor : NLR) qui peuvent être localisés au niveau membranaire ou cytoplasmique et sont spécialisés dans la détection de motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen-Associated Molecular Pattern : PAMP). Les PAMP sont des motifs moléculaires présents à la surface des pathogènes. Les PRR peuvent également jouer un rôle dans un contexte non infectieux *via* la reconnaissance des motifs moléculaires associés au danger (Danger-Associated Molecular Pattern : DAMP) qui sont des molécules du soi relarguées en cas de dégâts tissulaires.

En plus de la reconnaissance des caractéristiques structurelles des PAMP, le système immunitaire inné peut reconnaître les pathogènes *via* des caractéristiques fonctionnelles telles que les facteurs de virulence [11]. En effet, ces facteurs vont provoquer des modifications au niveau des cellules hôtes aboutissant à l'activation d'inflammasomes tel que l'inflammasome NLRP3 [12–14] qui est un complexe protéique présent dans les granulocytes. Il est appelé ainsi car il est formé à partir de NLR qui vont s'assembler et





permettre la maturation de cytokines pro-inflammatoires favorisant ainsi leur production par la cellule immunitaire.

Enfin, la distinction entre le soi et le non soi, par les cellules du système immunitaire, est essentielle à la mise en place d'une RI efficace et non délétère pour l'hôte. Elle va se faire grâce à la présence de protéines inhibitrices ou de molécules associées au soi (HAMP) telles que l'acide sialique à la surface des cellules de l'hôte et qui seront absentes au niveau du pathogène. Ainsi, les pathogènes peuvent être reconnus en tant que tels du fait de l'absence de ces protéines inhibitrices et/ou de ces molécules du soi [15].

#### **4) Déroulement de la RI innée**

Lorsqu'un pathogène réussit à traverser les barrières physico-chimiques, il va rencontrer un système de surveillance intervenant à plusieurs niveaux. Le premier est constitué de phagocytes présents au niveau supra-épithélial. En effet, des cellules phagocytaires ont été observées à l'intérieur des muqueuses ainsi qu'au niveau du lumen dans les alvéoles pulmonaires. Il a également été observé que des DC pouvaient étendre leurs dendrites dans le lumen du tractus intestinal et respiratoire [16]. Le second niveau est constitué des cellules épithéliales qui sont capables de détecter les pathogènes grâce à l'expression de PRR [17]. Enfin, le troisième niveau de surveillance se situe dans la lamina propria où résident des DC, des macrophages et des mastocytes. Ces cellules vont pouvoir détecter les pathogènes (ayant passés la barrière épithéliale) *via* leurs PRR et recruter des monocytes et des granulocytes circulants grâce à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. L'ensemble des cellules immunitaires présentes sur le site de l'infection vont mettre en place des mécanismes de défense menant à l'élimination du pathogène par phagocytose ou lyse.

Si cela ne suffit pas à contenir l'infection, le système immunitaire va mettre en place une défense intervenant à un niveau plus global. En effet, la réponse *in situ* décrite ci-avant va permettre la production de cytokines telles que l'interleukine (IL) -1 $\beta$ , le TNF (Tumor Necrosis Factor) et l'IL-6. Ces dernières vont agir sur le système nerveux central en provoquant la fièvre [18] ainsi que sur le foie où elles vont mener à la production des protéines C réactive et MBL (Mannose-Binding Protein) impliquées dans l'activation du système du complément [19] qui permet l'élimination du pathogène. Ces étapes sont connues comme faisant partie de la phase aigüe de l'inflammation. Si des pathogènes de

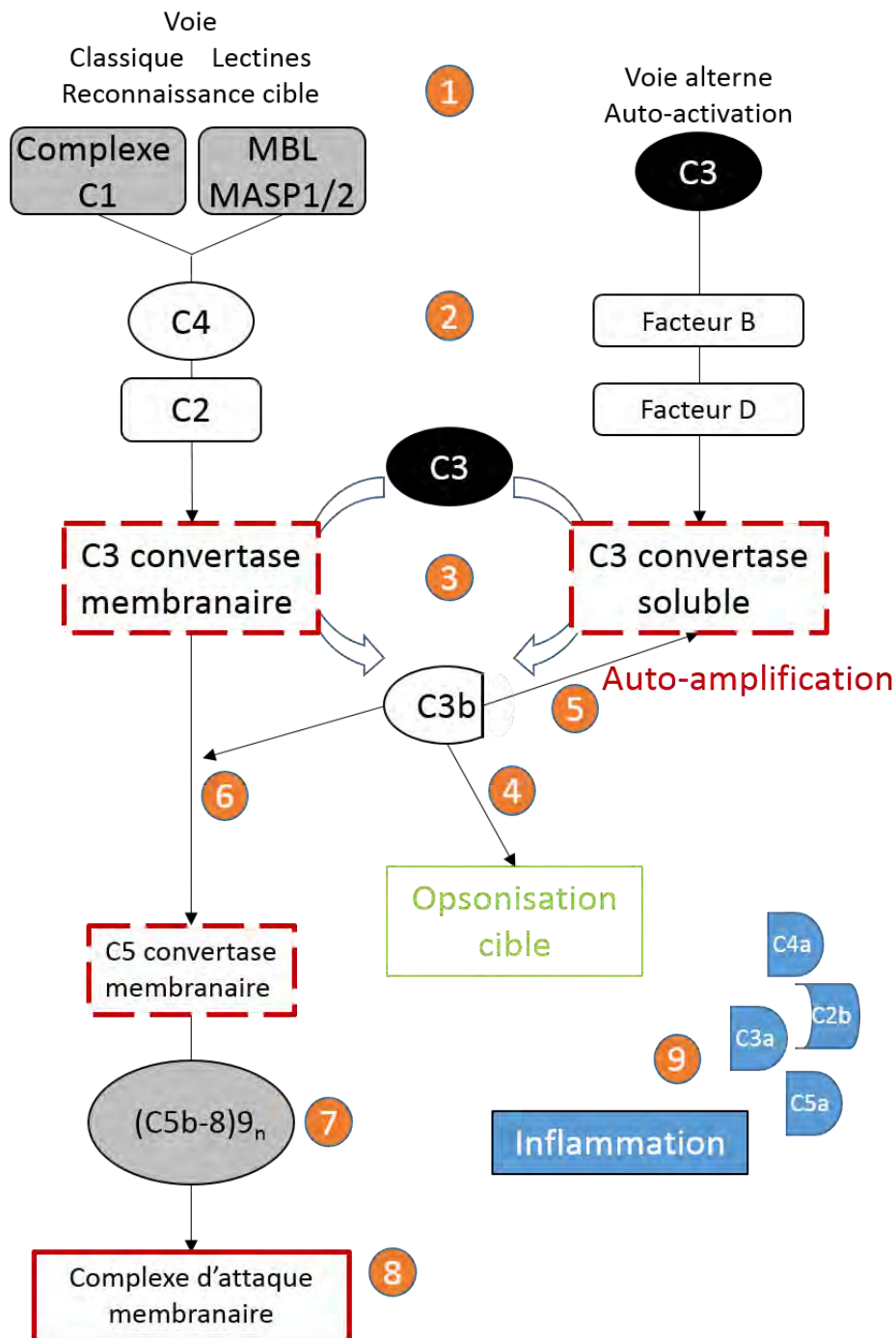


type bactérien atteignent la circulation sanguine, ils seront éliminés par le système du complément ainsi que par les monocytes et neutrophiles circulants exprimant des PRR (TLR, NLR et CLR) dont l'activation va permettre d'augmenter leur capacité de phagocytose et/ou provoquer leur dégranulation [20]. Lorsque les pathogènes sont des virus, d'autres cellules de l'immunité innée ayant des PRR adaptés vont entrer en jeu comme les pDC [21] que l'on retrouve au niveau circulant et dans la rate [22,23]. Une fois leurs PRR activés, ces cellules vont être capables de produire de l'interféron de type I (IFN- $\alpha$  et  $\beta$ ) en grande quantité. Les pDC sont une sous-population de DC. Chaque sous-population de DC va être impliquée dans la modulation d'une RI adaptée au pathogène puisqu'elle sera caractérisée par un profil spécifique d'expression de marqueurs et de PRR différents et qu'elle sera localisée à un endroit bien spécifique. Les DC sont notamment responsables de la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> [24,25] et font ainsi le lien entre RI innée et adaptative. La localisation et les types de PRR exprimés vont dépendre de la sous-population de DC qui va par conséquent mettre en place une réponse adaptée au pathogène rencontré.

### 5) Les facteurs solubles

Les facteurs solubles sont libérés suite à l'activation des cellules du SI. En effet, lorsque les cellules du SI vont détecter un pathogène *via* les PRR, elles vont mettre en place une réponse inflammatoire correspondant à la sécrétion de facteurs solubles qui permettent le recrutement de cellules au niveau du site de l'inflammation.

Il existe différents types de facteurs solubles comme les cytokines pro- et anti-inflammatoires ainsi que les substances vasodilatatrices (e.g. histamine). Les cytokines pro-inflammatoires (e.g. TNF- $\alpha$ , chimiokines et interleukines de type 1, 6, 12 et 18) vont permettre le recrutement des cellules du SI sur le site de l'inflammation en participant à leur chimiotactisme et en facilitant la diapédèse. En effet, la diapédèse (correspondant au passage des cellules du sang vers les tissus) est facilitée par l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales induite par le TNF- $\alpha$ . Cette diapédèse va également être facilitée par les substances vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote (NO) ou l'histamine qui permettent une augmentation de la perméabilité vasculaire. Enfin, les cytokines anti-inflammatoires (e.g. IL-10 ainsi que l'IL-4, IL-6 et le TGF- $\beta$  dans certaines circonstances) régulent la RI afin d'éviter d'éventuels effets délétères pour l'organisme.



**Figure 1 : Vue globale simplifiée de l'activation du système du complément**

3 voies d'activation différentes menant toutes à une voie finale commune ont été décrites : les voies classique, associée aux lectines et alterne. Ces trois voies diffèrent par leur mode d'activation pouvant être (1) la reconnaissance de la cible (les voies classique et associée aux lectines) ou l'auto-activation (voie alterne). Après (2) clivage de différentes molécules il y a formation d'une C3-convertase permettant (3) la génération du fragment C3b. Ce dernier va pouvoir (4) opsoniser la cible, (5) participer à la boucle d'auto-amplification de la voie alterne et (6) mener à la formation d'une C5-convertase. Il va ensuite y avoir production de C5b qui va (7) former un complexe avec les molécules C6, C7, C8 et C9. Le complexe  $(C5-8)_9_n$  formé correspond au (8) complexe d'attaque membranaire. Durant ces 3 voies d'activation sont également générés les fragments C3a, C4a, C2b et C5a appelées anaphylatoxines et participant à l'inflammation.

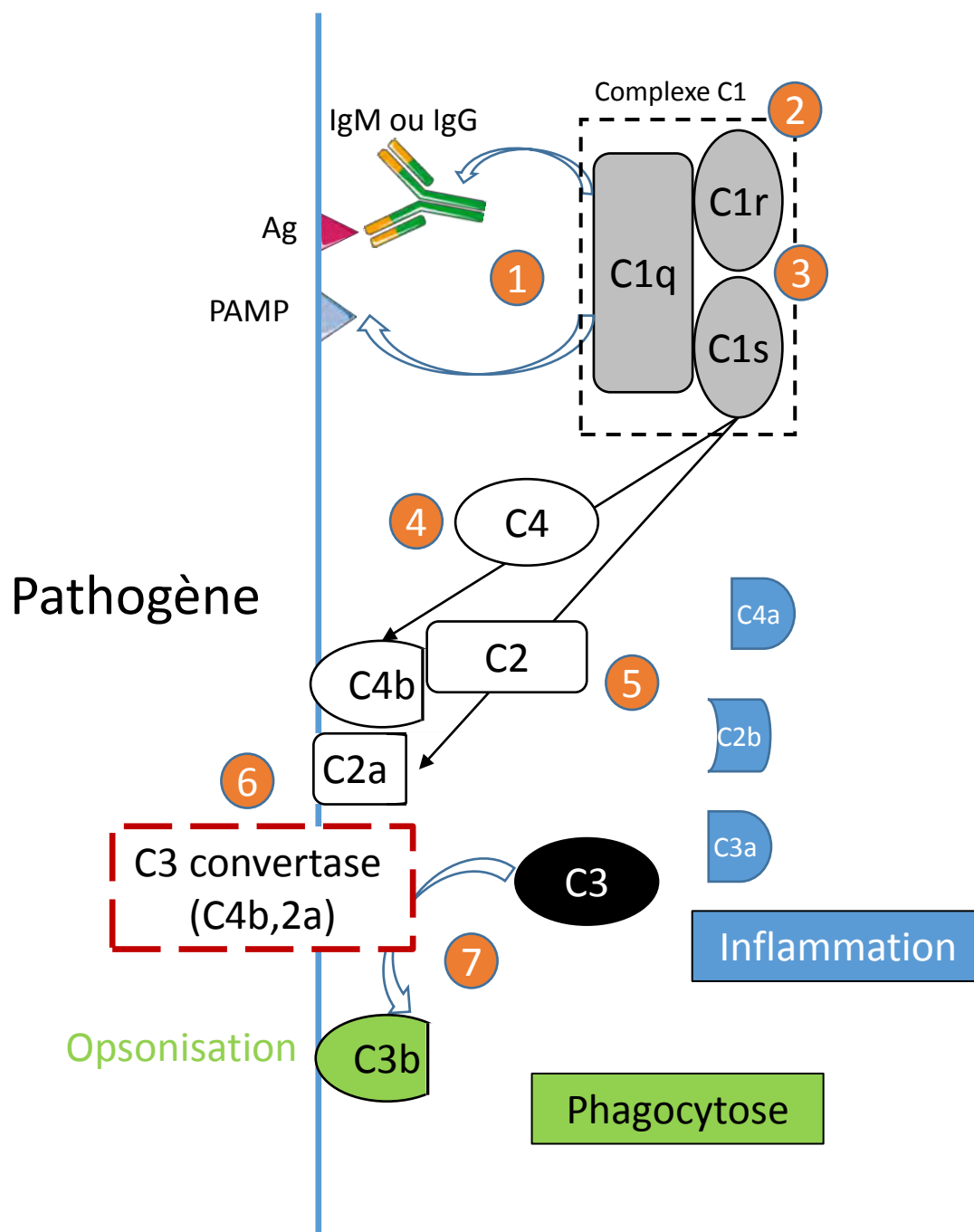
En plus de ces cytokines, chimiokines et substances vasodilatatrices, il existe également d'autres substances appartenant à l'immunité innée. Parmi ces substances figurent par exemple les défensines, le lysozyme ainsi que la lactoferrine. Tout d'abord, les défensines sont des peptides anti-microbiens, pouvant être produits par des cellules du SI ainsi que par les cellules épithéliales, qui vont s'insérer dans la membrane de certains pathogènes et provoquer leur lyse [26]. Ensuite, le lysozyme, produit par les macrophages, va dégrader les parois bactériennes [27]. Enfin, la lactoferrine est quant à elle libérée par les neutrophiles activés et va agir en séquestrant le fer inhibant ainsi la croissance bactérienne [28–30]. Il est également à noter que la lactoferrine possède des propriétés antifongiques et antivirales [31] participant ainsi à la défense de l'hôte contre les pathogènes.

Enfin, il existe une autre famille de facteurs solubles (décrite ci-après) appartenant au SI et faisant partie de ce qui est appelé : le système du complément.

## 6) Le système du complément

Le système du complément a été nommé ainsi car il était vu comme complétant l'activité des anticorps (produits par les plasmocytes durant la RI adaptative) dans la destruction des pathogènes et était par conséquent classé comme appartenant à l'immunité adaptative. Cependant, par la suite, trois voies d'activation différentes ont été décrites : les voies classique, alterne et associée aux lectines (**Figure 1**). Bien qu'elles mènent toutes à une voie finale commune, ces trois voies diffèrent par leurs phases d'initiation, leurs molécules initiatrices et les motifs reconnus par ces dernières. Grâce à la découverte de ces trois voies d'activation, il est devenu clair que le système du complément pouvait intervenir au niveau de la réponse immunitaire innée et donc en l'absence des anticorps. En effet, non seulement l'initiation des voies alterne et associée aux lectines n'est pas dépendante des anticorps mais celle de la voie classique peut également être réalisée directement par le pathogène. Cependant, elles sont activées localement au niveau du site infectieux provoquant une série d'événements pro-inflammatoires qui va s'amplifier au cours des différentes étapes. Ces voies d'activation doivent donc être régulées afin de ne pas provoquer d'effets délétères pour l'hôte.

Les trois voies d'activation du complément consistent en une cascade d'activation de proenzyme (ou zymogènes) en enzymes actives par clivage protéolytique donnant naissance à deux fragments. De manière générale, le plus gros fragment va porter l'activité protéase,



**Figure 2 : Voie classique d'activation du complément – élimination d'un pathogène**

La voie classique est activée *via* (1) la fixation de C1q directement sur le pathogène (PAMP ou anticorps fixés aux Ag) suivie de (2) l'activation de C1r qui va (3) cliver C1s. Ce dernier va (4) cliver C4 en C4b qui se fixe au pathogène de manière covalente et (5) va lier C2 lui permettant ainsi d'être clivé par C1s afin de produire C2a. C4b et C2a forment (6) la C3-convertase qui est liée à la surface du pathogène et va (7) cliver une grande quantité de C3 afin de produire C3b et C3a. C3b va opsoniser le pathogène tandis que C3a, C4a et C2b vont participer à l'inflammation.

se fixer au pathogène et est noté « b » alors que le plus petit, noté « a », appelé anaphylatoxine, est libéré et agit en tant que médiateur soluble ayant une action pro-inflammatoire. Il est à noter que la molécule C2 du complément fait exception à cette règle puisque le rôle des fragments C2a et C2b est inversé. Les trois cascades aboutissent à la formation d'une C3-convertase clivant C3, la molécule centrale du système du complément, ce qui engendre notamment la production de C3b. La fonction principale de C3b est l'opsonisation du pathogène afin de favoriser sa phagocytose. En effet, les cellules phagocytaires présentent des récepteurs au C3b permettant ainsi la phagocytose, qui est un phénomène très important pour la défense de l'hôte à la fois chez les Vertébrés et les Invertébrés [32]. Il est à noter que des homologues de C3 ont été découverts au sein de nombreux groupes au cours de l'évolution y compris chez les mammifères et les amphibiens [33,34]. En plus de son rôle dans l'opsonisation du pathogène, la molécule C3b va également pouvoir se lier à la C3-convertase afin de former une C5 convertase ce qui va produire les molécules C5a et C5b. Le peptide C5a porte l'activité pro-inflammatoire la plus importante de l'ensemble du système du complément tandis que C5b va être à l'origine de la voie finale commune d'activation du complément menant à la formation du complexe d'attaque membranaire qui permet la création de pores dans la membrane des pathogènes ce qui va entraîner leur lyse et par conséquent leur élimination.

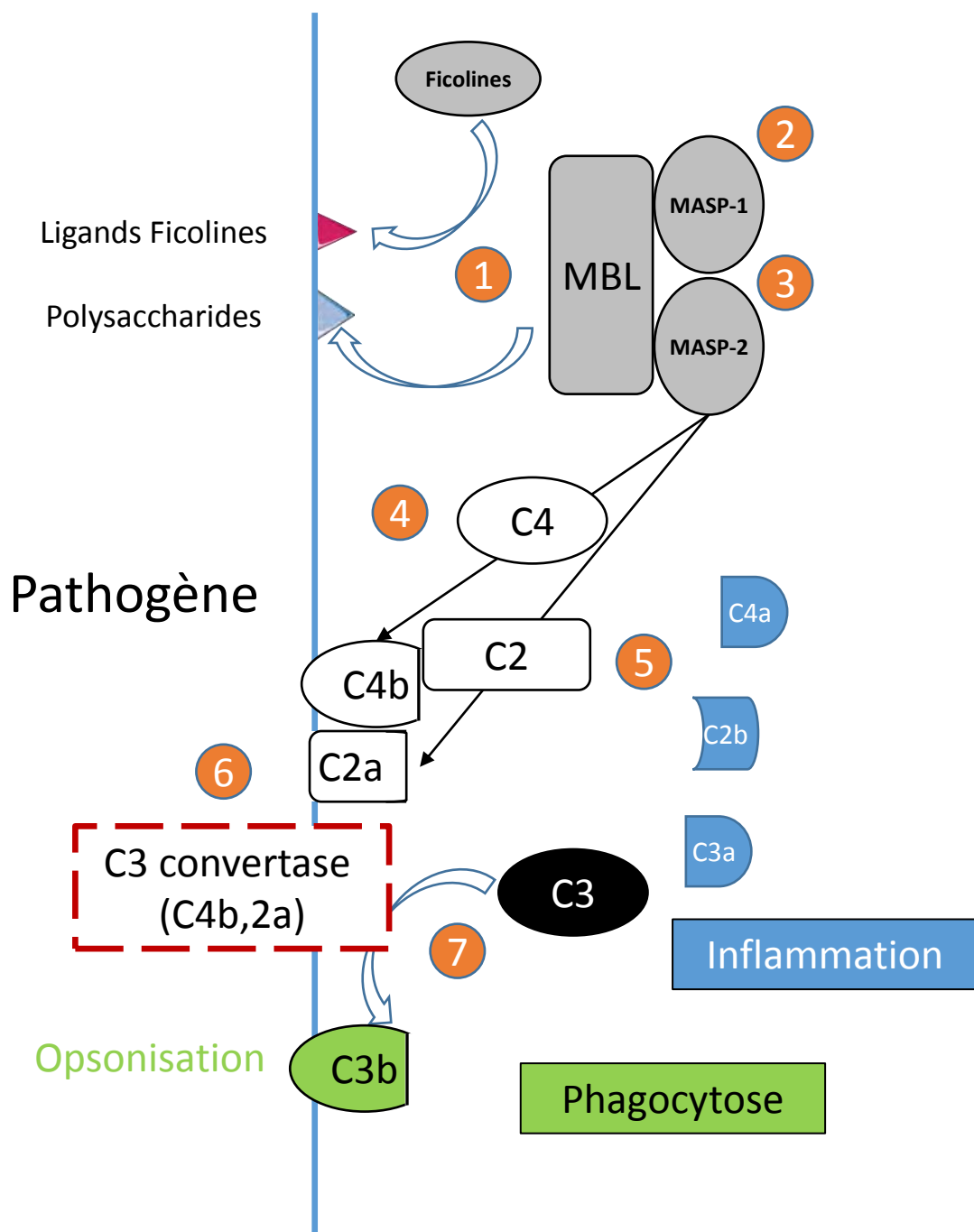
### *a) Les voies d'activation du complément*

#### **i. La voie classique**

La première voie, appelée voie classique, est composée de molécules désignées par la lettre « C » suivie d'un nombre. Il est à noter que ces nombres ne respectent pas forcément l'ordre de la cascade d'activation puisqu'ils ont été attribués dans l'ordre de leur découverte. La voie classique du complément débute par la fixation de C1q (**Figure 2**). Ce dernier peut se fixer soit directement sur le pathogène en reconnaissant certains PAMPs (e.g. protéines d'enveloppe de certains virus ; lipopolysaccharide (LPS)) [35], soit *via* les anticorps fixés à celui-ci (IgM et clusters d'IgG) [36]. Cette fixation de C1q, directe ou indirecte, faisant intervenir les anticorps ou non, fait que le système du complément peut être qualifié comme appartenant à la fois aux immunités innée et adaptative.

Suite à la fixation de C1q, un changement conformationnel permet l'activation de C1r qui va cliver C1s. Ces deux molécules sont associées à C1q et forment le complexe C1 [37]. C1s clive





**Figure 3 : Voie d'activation du complément associée aux lectines**

La voie associée aux lectines est activée *via* (1) la fixation de MBL (Mannose-Binding Lectine) et des Ficolines sur leurs ligands respectifs qui va être suivie de (2) l'activation de MASP-1 qui va (3) cliver MASP-2. Ce dernier va (4) cliver C4 en C4b qui se fixe au pathogène de manière covalente et (5) va lier C2 lui permettant ainsi d'être clivé par MASP-2 afin de produire C2a. C4b et C2a forment (6) la C3-convertase qui est liée à la surface du pathogène et va (7) cliver une grande quantité de C3 afin de produire C3b et C3a. C3b va opsoniser le pathogène tandis que C3a, C4a et C2b vont participer à l'inflammation.

C4 en C4b qui se fixe au pathogène de manière covalente et va lier C2 lui permettant ainsi d'être clivé par C1s afin de produire C2a [38]. C4b et C2a forment la C3-convertase qui est liée à la surface du pathogène et va cliver une grande quantité de C3 afin de produire C3b et C3a. C3b va opsoniser le pathogène tandis que C3a va initier une réponse locale pro-inflammatoire.

### ii. La voie associée aux lectines

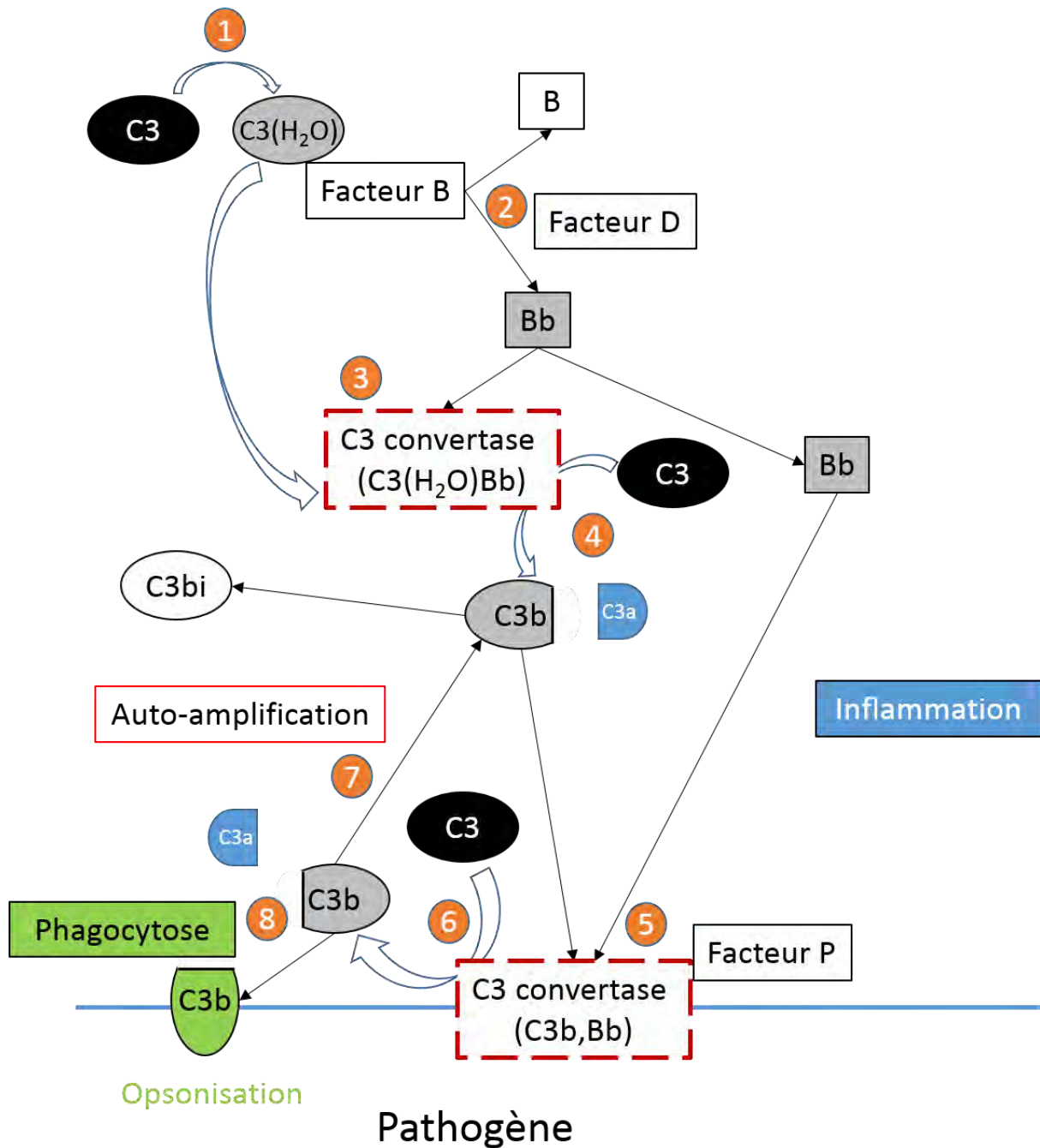
La voie associée aux lectines (**Figure 3**) est initiée par la fixation de lectines qui sont des protéines ayant une forte affinité pour les polysaccharides. La principale protéine initiatrice de la voie associée aux lectines est appelée Mannose-Binding Lectine (MBL). Elle se fixe aux carbohydrates présents à la surface de la plupart des micro-organismes et contenant du mannose [35]. Cette protéine est proche de C1q et circule en faible concentration dans le sang mais sa production par le foie peut être augmentée lors de la phase aiguë de l'inflammation. Il existe un second groupe de lectines permettant l'initiation de cette voie du complément. Ce second groupe contient les ficolines qui sont associées aux protéines MBL-Associated Serine Proteases (MASP) et circulent jusqu'à reconnaître des groupes *N*-acetylglucosamine à la surface de bactéries [39,40]. Il est à noter que les cellules de l'hôte sont, quant à elles, couvertes de molécules contenant d'autres groupes de sucres tels que l'acide sialique. Ainsi, la voie associée aux lectines ne peut s'initier au niveau des cellules du soi et ces dernières ne risquent par conséquent pas d'être éliminées par le système du complément.

Après la phase d'initiation, le déroulement de la voie associée aux lectines ressemble très fortement à la voie classique puisque MBL forme un complexe avec deux zymogènes MASP-1 et MASP-2 très homologues à C1r et C1s. Tout comme C1r et C1s, MASP-1 et MASP-2 vont être à l'origine du clivage de C4 [41] et de C2 menant à la formation d'une C3-convertase de la voie associée aux lectines identique à celle de la voie classique.

Il a été montré qu'une déficience en MBL provoque une augmentation des infections chez les enfants en bas âge n'étant plus protégés par les anticorps de leur mère et ne présentant pas encore une immunité adaptative mature [42].

### iii. La voie alterne

Cette voie d'activation du complément est appelée ainsi car elle a été découverte après la voie classique. Elle est composée de molécules désignées par des lettres capitales (e.g. Facteur B, D) et ne requiert pas de fixation d'une protéine initiatrice contrairement aux deux



**Figure 4 : Voie alterne d'activation du complément**

La voie alterne du complément va être activée par (1) le clivage spontané de C3 ce qui va aboutir à la formation de C3(H<sub>2</sub>O) sur lequel va venir se fixer le facteur B. Ce dernier va (2) être clivé par le facteur D générant un fragment Bb qui va pouvoir (3) se lier à C3(H<sub>2</sub>O) pour former le complexe C3(H<sub>2</sub>O)Bb portant l'activité C3-convertase. Cette dernière va être soluble et permet (4) le clivage de C3 en C3b et C3a. Une grande partie de C3b ne va pas se fixer au pathogène et être inactivée tandis qu'une minorité de fragments C3b va pouvoir (5) se fixer et s'associer à Bb pour former une C3 convertase membranaire (C3b,Bb). Le facteur P va agir comme stabilisateur de la C3 convertase membranaire et celle-ci va (6) produire une grande quantité de C3b pouvant (7) initier à nouveau la voie alterne ou (8) opsoniser le pathogène. Les fragments C3a formés durant cette voie vont être impliqués dans l'inflammation.

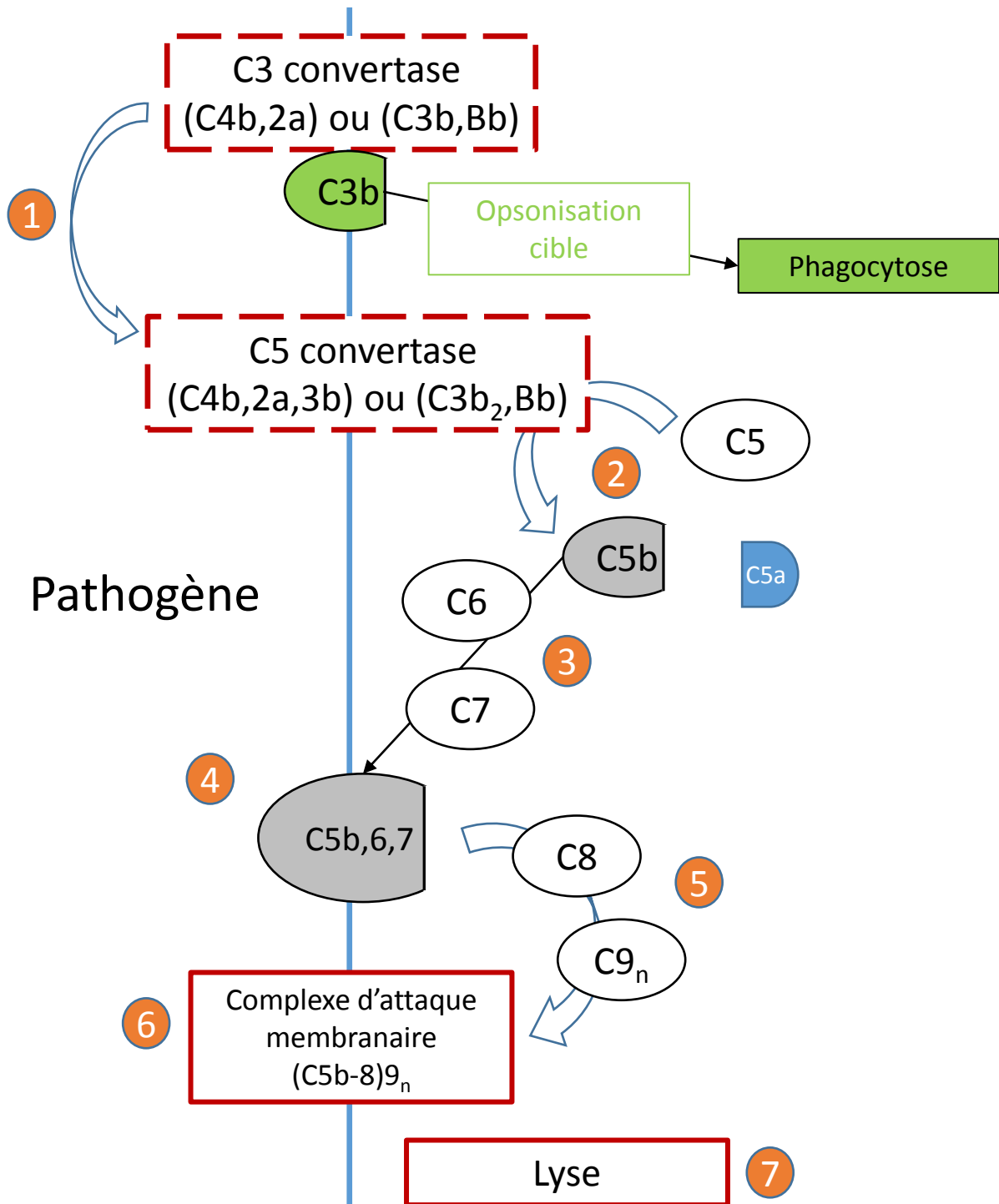
autres voies. En effet, la voie alterne (**Figure 4**) peut être initiée par le clivage spontané de C3 par hydrolyse provoquant ainsi un changement conformationnel de cette dernière qui sera alors notée C3(H<sub>2</sub>O). Ce changement de conformation permet la fixation du facteur B qui est ensuite clivé par le facteur D en B et B<sub>b</sub>. Ce dernier fragment se fixe à C3(H<sub>2</sub>O) pour former le complexe C3(H<sub>2</sub>O)B<sub>b</sub> [43] correspondant à une C3 convertase ayant pour particularité de ne pas être fixée au pathogène mais libre [44] et qui, bien que produite en faible quantité, va cliver un grand nombre de molécules C3 en C3a et C3b. Ce dernier est en grande partie inactivé puisqu'il ne se fixera pas au pathogène. Cependant, la minorité de fragments C3b restante va pouvoir se fixer au pathogène et, de la même manière que décrite précédemment, va provoquer la formation d'une C3 convertase (C3b, B<sub>b</sub>) qui ne sera pas soluble mais fixée à la surface du pathogène. Le facteur P (= Properdine), pouvant se fixer au pathogène, va agir comme stabilisateur de la C3 convertase [45,46] et donc potentialiser son action qui va être la production d'une grande quantité de C3b pouvant lui-même initier à nouveau la voie alterne ou opsoniser le pathogène. La voie alterne agit donc comme une boucle d'auto-amplification et peut augmenter l'efficacité des autres voies d'activation du complément.

De manière intéressante, la C3-convertase ne sera effectivement présente qu'à la surface du pathogène puisque lorsque C3b va se fixer aux cellules hôtes, elle va être inactivée par de nombreuses protéines régulatrices présentes à la fois dans le plasma et à leur surface. Etant donné qu'elle n'est pas initiée par une reconnaissance du pathogène, la voie alterne utilise le facteur H, la properdine et C3b pour distinguer le soi du non soi [35].

L'activation de la voie alterne semble ainsi avoir lieu partout et à tout moment dans l'organisme mais à un taux très bas. Elle peut ensuite être inhibée par des molécules de régulation associées au soi ou être amplifiée contre le non soi ne présentant pas ces molécules [47]. Il est à noter que la molécule de régulation clé de la voie alterne semble être le facteur H qui reconnaît de manière prédominante les motifs moléculaires associés à l'hôte (Host-Associated Molecular Patterns : HAMPs) tels que l'acide sialique [35,48].

#### iv. La voie finale commune

Cette voie finale commune (**Figure 5**) a pour origine le fragment C3b produit par l'ensemble des trois voies d'activation du système du complément. Ce dernier va être à l'origine de deux phénomènes distincts que sont d'une part, la phagocytose et d'autre part, la lyse du pathogène. Pour commencer, la phagocytose du pathogène va être permise par la fixation

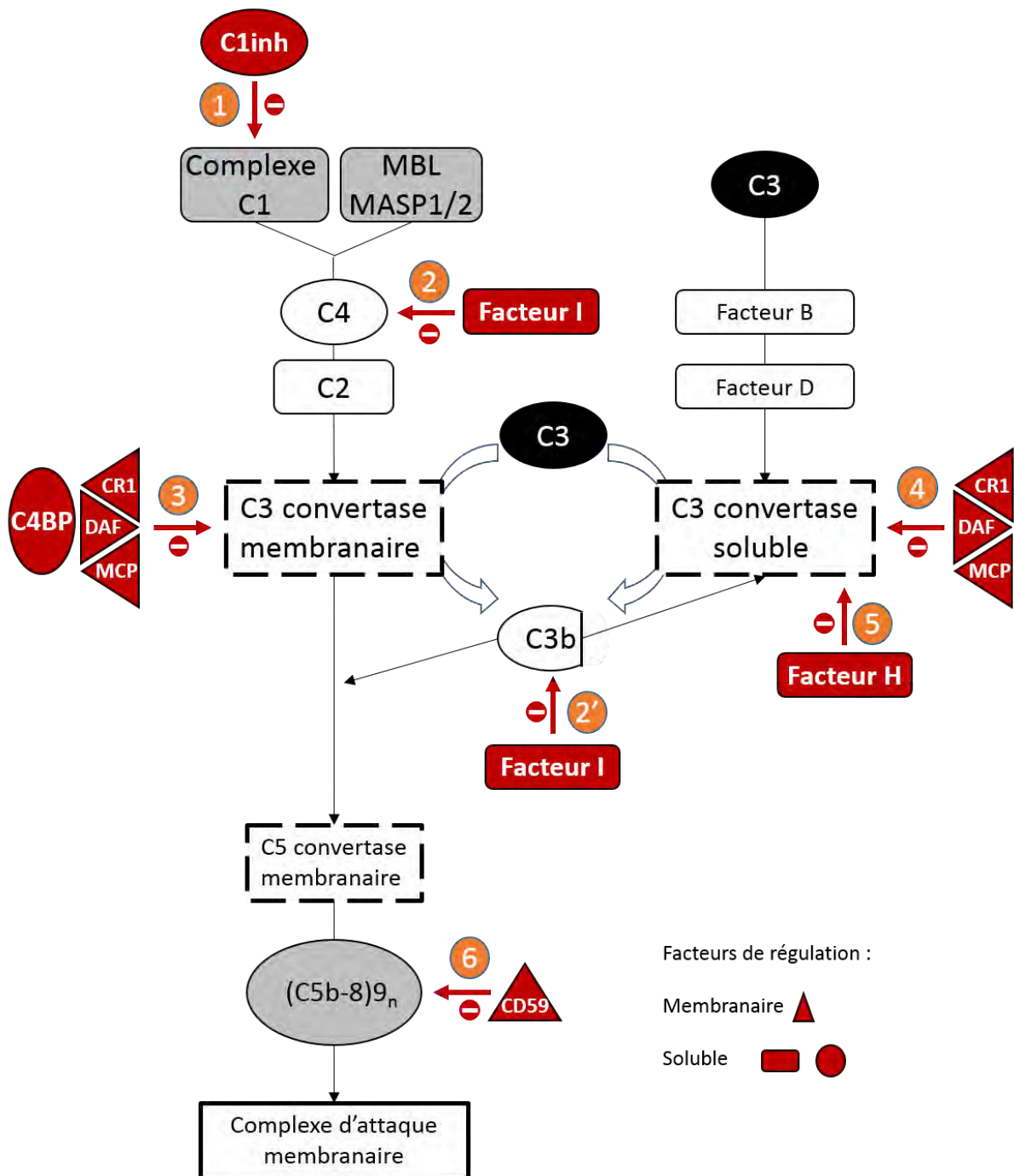


**Figure 5 : Voie finale commune**

L'ensemble des voies d'activation du système du complément résultent en la production de fragments C3b participant à deux phénomènes distincts que sont d'une part la phagocytose et d'autre part la lyse du pathogène. Cette dernière commence par (1) la formation d'une C5-convertase (C4b,2a,3b pour les voies classique et associée aux lectines ou C3b<sub>2</sub>,Bb pour la voie alterne) qui va (2) cliver C5 en C5a et C5b. C5b va ensuite (3) fixer une molécule C6 puis C7 pour (4) former le complexe C5b,6,7 auquel (5) les molécules C8 et C9 vont s'ajouter pour (6) former un pore appelé complexe d'attaque membranaire. Ce dernier va permettre la sortie de solutés et d'ions présents dans le cytoplasme ainsi que l'entrée d'enzymes comme des lysozymes dans la cellule. L'ensemble de ces perturbations va provoquer (7) la destruction complète du pathogène par lyse cellulaire. La molécule C5a relarguée au cours de la voie finale commune participera quant à elle à l'inflammation.

de C3b sur le récepteur 1 au complément (Complement Receptor 1 : CR1) présent à la surface des macrophages et des granulocytes. Cette fixation ne suffira pas à elle seule à activer les macrophages qui aura lieu grâce à l'action supplémentaire de C3a et de C5a dont les récepteurs sont également présents sur les macrophages. C3a et C5a vont également activer les mastocytes et participer au recrutement des cellules phagocytaires, des neutrophiles et des monocytes. En effet, les anaphylatoxines C3a, C4a et C5a relarguées après activation entraînent la contraction des muscles lisses, augmentent la perméabilité vasculaire et le recrutement des cellules du système immunitaire [49–51]. L'augmentation de la perméabilité vasculaire va à la fois permettre le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'infection mais également le transport des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) vers les ganglions lymphatiques favorisant ainsi la mise en place de l'immunité adaptative.

Outre son rôle dans l'opsonisation, C3b est également à l'origine de la voie finale commune du système du complément permettant la lyse du pathogène et débutant par la formation de la C5-convertase. Dans le cas des voies classique et associée aux lectines, la C5-convertase sera formée du complexe C4b<sub>2</sub>,2a,3b [52] tandis que celle de la voie alterne sera composée de C3b<sub>2</sub>,Bb [53]. Ces différentes C5-convertases vont avoir un but commun consistant à cliver C5 en C5a et C5b [54,55]. C5b va ensuite fixer une molécule C6 puis C7 pour former C5b<sub>6,7</sub> [56]. La fixation de C7 entraîne un changement conformationnel qui va exposer un site hydrophobe permettant son insertion dans la membrane. Ce procédé sera le même pour les derniers composants C8 et C9 s'associant au complexe C5b<sub>6,7</sub> [57]. Plusieurs molécules C9 (10 à 16) vont se polymériser pour former un pore appelé complexe d'attaque membranaire [58]. Le diamètre de ce pore étant de 100 Å, il va permettre le passage des solutés et des ions présents dans le cytoplasme provoquant ainsi une perturbation du gradient de protons et donc de l'homéostasie cellulaire tout en permettant le passage d'enzymes comme des lysozymes dans la cellule. L'ensemble de ces perturbations va provoquer la destruction complète du pathogène [59–61]. Cette action de lyse du pathogène par le système du complément semble être secondaire par rapport à celle d'opsonisation par C3b et de pro-inflammation par les anaphylatoxines. En effet, une déficience en molécules C5 à C9 ne semble augmenter les risques d'infections que par quelques types de bactéries [42,62].



**Figure 6 : Principales régulations du système du complément**

La première régulation du système du complément consiste en l'inactivation rapide des composants actifs (fragments généralement notés « b ») ne se liant pas aux pathogènes dans le but d'éviter qu'ils ne se fixent aux cellules hôtes. Il existe également différentes molécules permettant de réguler le système du complément. Ces molécules peuvent être membranaires (triangle) ou plasmatiques (ovale ou rectangle). Un premier point de régulation se situe au niveau de la voie classique où **(1)** C1inh va entrainer la dissociation du complexe C1. Il existe également le facteur I qui va pouvoir **(2)** cliver C4b en C4c et C4d et **(2')** cliver C3b en dérivé inactif noté C3bi. La C3-convertase membranaire des voies classique et associée aux lectines est **(3)** régulée négativement par C4BP. Les C3-convertases membranaire et soluble sont toutes les deux régulées négativement par **(3 et 4)** les facteurs membranaires CR1, DAF et MCP. La C3 convertase soluble de la voie alterne est quant à elle également régulée par **(5)** le facteur H. L'ensemble de ces molécules vont perturber la formation de la C3-convertase. CR1 et DAF vont entrer en compétition avec le facteur B et/ou empêcher la fixation de Bb potentiellement formé tandis que le facteur plasmatique H se fixe à C3b. Enfin, la voie finale commune est régulée par **(6)** CD59 présente sur les cellules hôtes et aussi appelée protectine va inhiber la polymérisation de C9 et donc la formation du complexe d'attaque membranaire.

### *b) Régulation du système du complément*

Le système du complément permet à l'organisme de lutter contre les infections [63] mais requiert une forte régulation (**Figure 6**). En effet, un emballement des cascades d'activation pourrait avoir des effets délétères contre le soi [64]. L'une des principales régulations consiste en l'inactivation rapide des composants actifs (fragment généralement notés « b ») ne se liant pas au pathogène ce qui permet d'éviter leur fixation aux cellules hôtes voisines ou accessibles *via* la circulation sanguine. Les autres régulations interviennent à différentes étapes et mettent en jeu des protéines régulatrices.

N'étant pas activée par des molécules initiatrices spécifiques se liant directement ou indirectement au pathogène, il est logique que la voie alterne soit celle nécessitant le plus de régulation. Ainsi, la voie alterne est régulée par CR1 et DAF (Decay-Accelerating Factor) qui vont entrer en compétition avec le facteur B et/ou empêcher la fixation de Bb potentiellement formé [65]. Il existe également un clivage de C3b en dérivé inactif noté C3bi par le facteur I [66] présent dans le plasma et ses co-facteurs CR1 et MCP (membrane co-factor of proteolysis) présents sur la membrane des cellules hôtes. De plus, le facteur H, lui aussi plasmatique, peut également empêcher la formation de C3-convertase d'une part en se fixant à C3b et d'autre part en agissant comme co-facteur du facteur I grâce à son affinité pour l'acide sialique présent sur les cellules des Vertébrés [67,68]. L'ensemble de ces régulateurs de la voie alterne est bien entendu indispensable pour ne pas entraîner de dommages collatéraux délétères pour l'organisme. Le facteur D, appartenant à la voie alterne, est une exception à bien des égards. En effet, contrairement à de nombreuses molécules ayant des structures et fonctions équivalentes entre les voies d'activation du complément et étant codées par des gènes homologues souvent groupés au sein du même locus, le facteur D ne trouve aucun équivalent fonctionnel dans les deux autres voies et est également le seul facteur à être circulant sous forme active plutôt que sous la forme d'une pro-enzyme [69]. Cette dernière caractéristique est essentielle à l'activation de la voie alterne et sans danger pour les cellules hôtes. En effet, le facteur D ne peut cliver son substrat (facteur B) que lorsqu'il est fixé à C3b c'est-à-dire proche du lieu de l'infection [69]. La voie classique est quant à elle régulée par C1 inhibiteur (C1inh) qui va entraîner la dissociation du complexe C1 réduisant ainsi son temps d'action sur le clivage de C4 et C2 [70,71]. La fixation des fragments C3b générés par la voie classique sur les cellules hôtes est régulée de la même manière que celle décrite pour la voie alterne avec le factor I qui va





pouvoir cliver C3b en C3bi et C4b en C4c/C4d [66]. Il existe également des protéines membranaires (cellules hôtes) ou plasmatiques qui vont pouvoir agir comme co-facteurs du Facteur I. Les protéines membranaires sont CR1 [72] et MCP [73] tandis que les protéines plasmatiques sont C4BP [74–76] et le facteur H [67,68]. De plus, CR1 et DAF vont permettre de limiter la formation de la C3-convertase en provoquant sa dissociation, en diminuant sa formation ou encore en agissant comme co-facteurs du facteur I [72]. Enfin, CD59 présente sur les cellules hôtes et aussi appelée protectine, va inhiber la polymérisation de C9 et donc du complexe d'attaque membranaire [77–79].

### *c) Evolution du système du complément*

La phylogénie du système du complément a été beaucoup étudiée [80–84] et il a été mis en évidence que le système du complément est présent au cours de l'évolution chez tous les Vertébrés ainsi que dans certaines espèces d'Invertébrés. En effet, des composants du système du complément ont été découverts chez les espèces de Vertébrés les plus primitives comme la Lamproie [85] et les Myxines [86]. De plus, quelques protéines dont les séquences sont homologues à celles de composants du complément, ont été trouvées chez des Invertébrés (e.g. étoile de mer, oursins, arthropodes, nématode *C. Elegans*) mais leurs fonctions restent à être définies [87].

L'analyse précise du fonctionnement du système du complément chez l'Homme a montré que les Ac peuvent activer la voie des lectines *via* MBL (qui se lie aux carbohydrates des Ig) et que C1q peut se fixer directement au pathogène *via* les PAMP. Ainsi, la voie classique peut être activée autrement que par les Ac et ces derniers peuvent également activer la voie des lectines. Cela amène à penser que ces cascades ont évolués à partir de duplications géniques suivies de divergences fonctionnelles [88]. Cette hypothèse est soutenue par le fait que, d'un point de vue génomique, de nombreux gènes codant des molécules du complément (e.g. facteur H, C4BP, DAF, MCP) sont regroupés [89–91]. Ainsi, des duplications suivies d'une évolution indépendante pourraient être à l'origine de cette diversité et donc de la mise en place de ce système complexe et multifonctionnel essentiel à la réponse immunitaire qu'est le système du complément.

D'un point de vue évolutif, les trois voies d'activation du système du complément semblent être apparues de manière séquentielle en commençant par la mise en place de la voie des lectines. Le système du complément aurait ensuite évolué à partir de cette dernière pour

Molécule ou équivalent	Mammifères	Amphibiens
C1q	+	+
MBL	+	
Ficolines	+	+
C1r/C1s	+	
MASP	+	+
C2/Facteur B	+	+
Facteur D	+	
C4	+	+
C3	+	+
C5	+	
C6	+	+
C7	+	+
C8	+	+
C9	+	
Facteur H/DAF	+	+
CD59	+	
Facteur I	+	+
C1 inh	+	+

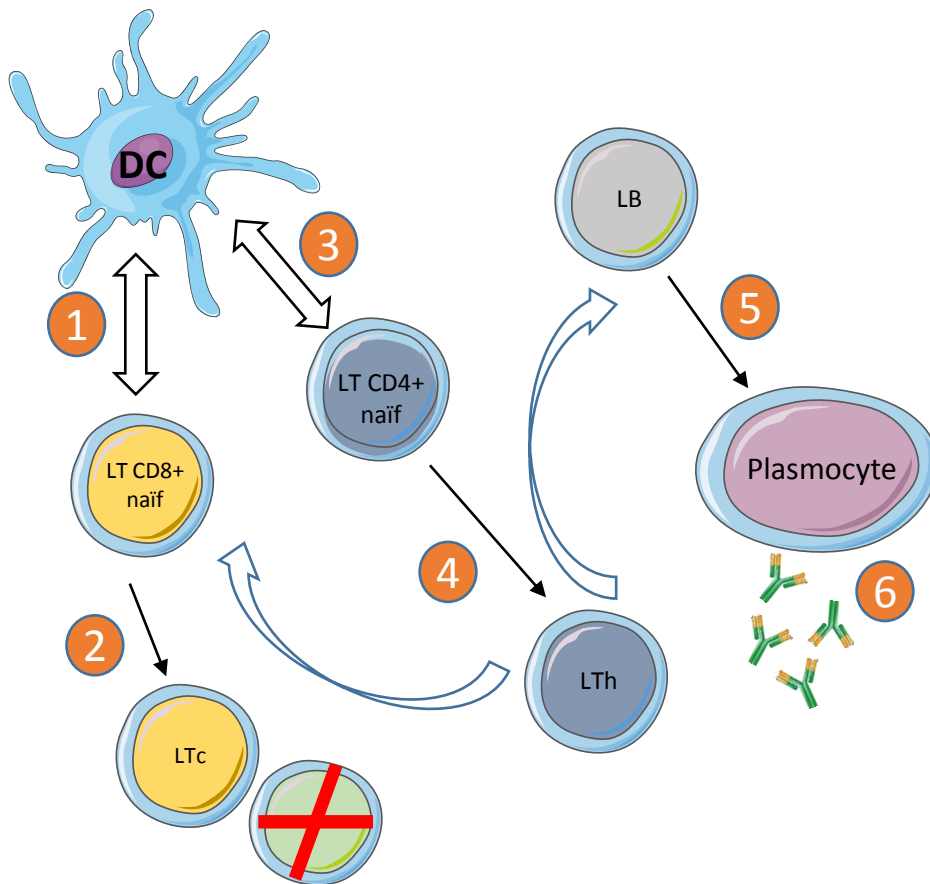
**Tableau 1 : Comparaison des principaux composants du système du complément entre Amphibiens et Mammifères**

Le « + » indique que la protéine a été purifiée et caractérisée ou que des séquences d'ADNg ou d'ADNc orthologues à celles des mammifères ont été découvertes. Les molécules n'ayant pas de « + » sont toutes censées exister au vu de la découverte d'un équivalent dans d'autres groupes moins évolués mais leur séquence diffère peut être de manière trop importante par rapport à celle des mammifères (Tableau adapté de Dodds et al., 2007). Ce type d'étude se base sur les séquences et fonctions des molécules découvertes chez les mammifères dans le but de mettre en évidence un équivalent chez d'autres groupes phylogénétiques mais il se pourrait que dans certains cas, les séquences aient trop dérivées pour que cela soit possible. D'un point de vue global, le système du complément des mammifères et des amphibiens semble assez similaire puisque les 3 voies d'activation du système du complément aboutissant aux 3 grandes fonctions que sont l'inflammation ainsi que l'osponisation et la lyse du pathogène sont retrouvées. De plus, d'un point de vue moléculaire, de nombreux homologues ont été découverts (e.g. C1q, MASP, C2/facteur B, C3, C4, C6, C7 et C8 ainsi que les protéines régulatrices : H/DAF\_like, Facteur I, C1inh et properdine). A l'inverse, des homologues pour MBL, C1r/C1s, facteur D, C5, C9, CR3 like et CD59 like restent à être identifiés chez les amphibiens. Le fonctionnement global du système du complément étant similaire, la présence de ces molécules ou de molécules ayant une activité similaire est fortement suspectée.

donner les 3 voies décrites à ce jour chez les Vertébrés à mâchoire. L'émergence de la voie classique ainsi que de la voie terminale commune et de ses capacités lytiques apparaissent donc plus tardivement d'un point de vue évolutif [92]. En effet, La voie classique est désormais considérée comme étant une variante de la voie des lectines en se basant sur l'hypothèse selon laquelle C1q se serait spécialisé au cours de l'évolution pour se lier aux Ig alors qu'il devait auparavant se lier aux PAMP [93].

Pour conclure sur la chronologie d'apparition des voies d'activation du système du complément, les données obtenues à ce jour au niveau moléculaire et fonctionnel (basées sur la découverte de protéines homologues à MASP, C1q et au facteur D) semblent indiquer que la voie des lectines, la voie classique et la voie alterne remonteraient respectivement aux ascidies (groupe précédant les Vertébrés d'un point de vue évolutif), aux premiers Vertébrés (poissons cartilagineux ex : requin, raie) et aux poissons osseux (ensemble des poissons hormis raie, requin et chimère).

Etant donné le fait que nous avons utilisé à la fois l'amphibien et la souris au cours de cette thèse, nous nous sommes demandé s'il pouvait exister des divergences concernant le système du complément. D'un point de vue global, le système du complément des mammifères et des amphibiens semble assez similaire (**Tableau 1**). En effet, tout comme les mammifères, les amphibiens présentent les 3 voies d'activation aboutissant aux 3 grandes fonctions que sont l'inflammation ainsi que l'osponisation et la lyse du pathogène. De plus, d'un point de vue moléculaire, de nombreux homologues ont été découverts (e.g. C1q, MASP, C2/facteur B, C3, C4, C6, C7 et C8 ainsi que les protéines régulatrices : H/DAF\_like, Facteur I, C1inh et properdine). A l'inverse, des homologues pour MBL, C1r/C1s, facteur D, C5, C9, CR3 like et CD59 like restent à être identifiés chez les amphibiens [93] mais il est à noter que l'existence de molécules ayant une activité similaire est fortement suspectée chez ces derniers puisque le fonctionnement global du système du complément semble être analogue à celui des mammifères. En effet, ce type d'étude se base sur les séquences et fonctions des molécules découvertes chez les mammifères dans le but de mettre en évidence un équivalent chez d'autres groupes phylogénétiques. Cependant, il se pourrait que l'évolution indépendante à partir d'ancêtres communs empêche la découverte de certains homologues [93]. Ainsi, bien qu'il ait été moins étudié, il semblerait que le système du complément des amphibiens soit équivalent à celui des mammifères.



**Figure 7 : Schéma général des principales étapes de la RI adaptative**

Les DC vont pouvoir **(1)** cross-présenter l'Ag aux LT CD8<sup>+</sup> naifs qui vont **(2)** se différencier en LT cytotoxiques (LTc) et lyser les cellules cibles. Elles peuvent également **(3)** présenter l'Ag aux LT CD4<sup>+</sup> qui vont **(4)** se polariser en LT helper (LTh) responsables de l'orchestration et/ou de la régulation de la RI en participant notamment à l'activation des LTc et des LB. Les LB vont **(5)** se différencier en plasmocytes qui vont **(6)** sécréter des Ac.

## C. L'immunité adaptative

### 1) Généralités

La RI adaptative est plus longue à se mettre en place car, contrairement à la RI innée, elle est spécifique au pathogène. C'est pour cette raison qu'elle est aussi appelée RI secondaire ou spécifique. Les principaux acteurs de la RI adaptative sont les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) (regroupant principalement les macrophages et les cellules dendritiques (DC)) ainsi que les lymphocytes (**Figure 7**). Ces derniers sont constitués des lymphocytes B (LB) qui sont responsables de la production d'Ac et des lymphocytes T (LT). Les LT peuvent quant à eux être subdivisés en LT CD8<sup>+</sup> qui sont cytotoxiques (LTc) et en LT CD4<sup>+</sup> (LT helper : LTh ou auxiliaires) qui vont se polariser en différents profils permettant d'une part, de soutenir l'action des LB et d'autre part, de mettre en place une réponse adaptée au pathogène.

Afin d'assurer le processus dynamique qu'est la RI, certaines cellules appartiennent à la fois au pan inné et au pan adaptatif comme les CPA. Dans ce contexte, les DC sont des cellules très importantes puisqu'elles vont permettre le passage entre RI innée et RI adaptative grâce à leur fonction de présentation de l'antigène. En effet, les DC appartiennent à la famille des CPA tout comme les macrophages (**cf. partie I.A.2.**). Elles sont cependant qualifiées de professionnelles car il semblerait qu'elles constituent le type cellulaire le plus efficace quant à la présentation de l'Ag aux LT. Elles appartiennent ainsi à la RI adaptative de par leur fonction de polarisation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs vers différentes sous-populations de LTh. Chaque sous-population de LT CD4<sup>+</sup> aura une action sur des effecteurs de la RI spécifiques au pathogène et la coopération entre DC et LT CD4<sup>+</sup> est par conséquent vitale pour la mise en place de la RI adaptative. Il est également à noter que les cellules dendritiques peuvent interagir avec les LT CD8<sup>+</sup> grâce à un phénomène appelé : présentation croisée de l'Ag. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement aux DC ainsi qu'à leurs partenaires principaux, les LT CD4<sup>+</sup>.

### 2) Les cellules dendritiques

#### a) Généralités

Contrairement aux LB capables de reconnaître l'Ag directement sous sa forme native, les LT ne peuvent quant à eux le reconnaître que s'il est apprêté et présenté par une CPA. Cette présentation est permise par le fait que les CPA expriment les molécules du Complexe

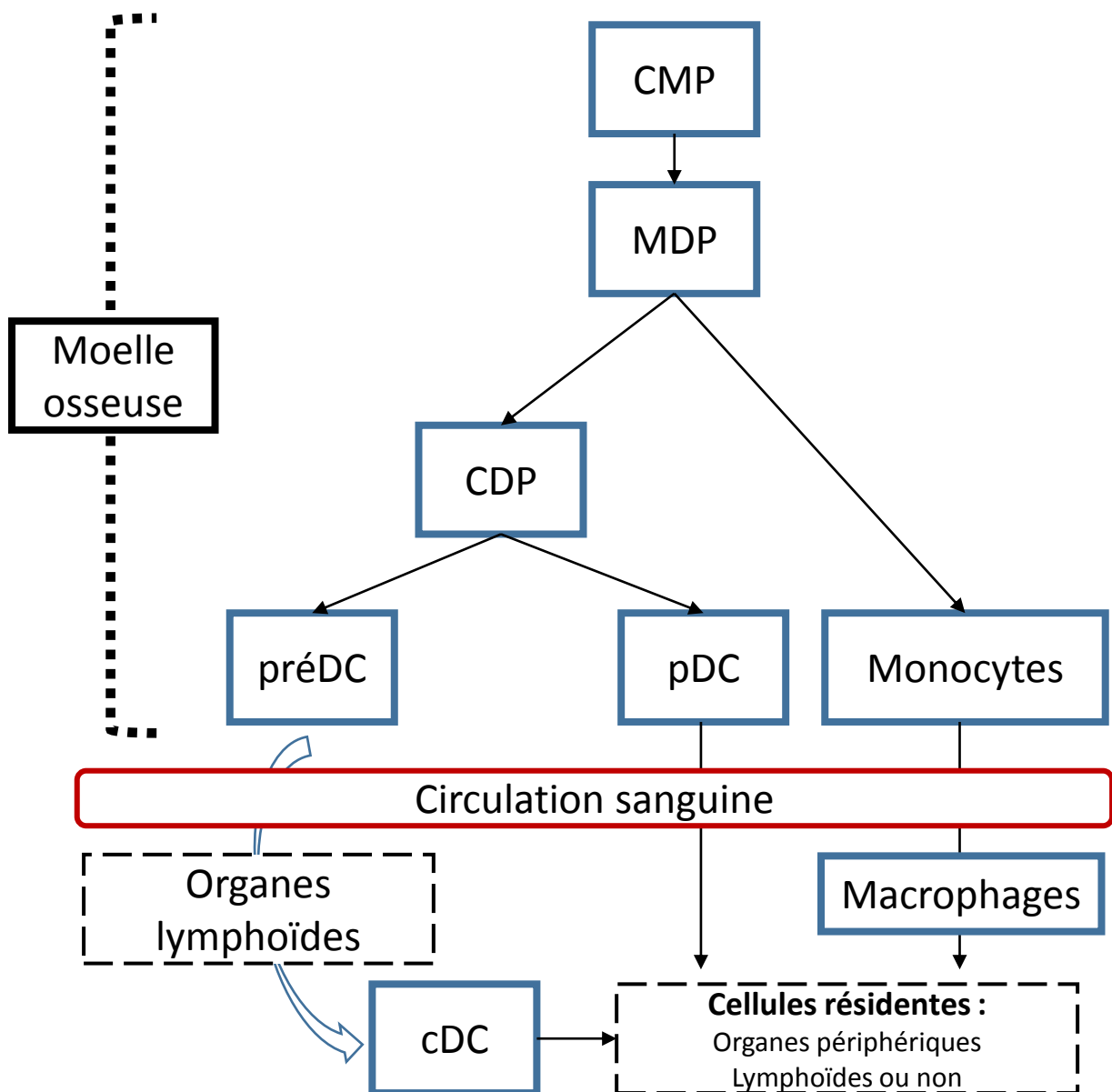


Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Il faut savoir que le CMH regroupe un ensemble de molécules membranaires pouvant être séparé en deux groupes : la classe 1 (CMH I) et la classe 2 (CMH II). Le CMH I est constitué de molécules permettant la présentation d'Ag endogènes ou de molécules du soi et sont par conséquent exprimées par l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme. Le CMH II est quant à lui exprimé par les CPA et regroupe un ensemble de molécules permettant la présentation d'Ag exogènes.

Il existe plusieurs types cellulaires appartenant au SI et capables de réaliser la présentation de l'antigène tels que les monocytes, les macrophages, les LB et les DC. Cependant, les DC présentent un intérêt tout particulier car elles sont qualifiées de CPA professionnelles en raison de leur efficacité plus élevée à capturer et à présenter l'antigène par rapport aux autres CPA. En effet, elles sont capables de mettre en place un ensemble de mécanismes leur permettant de capter l'Ag tels que la phagocytose [7], la macropinocytose [94] et l'expression de récepteurs impliqués dans l'endocytose tels que DEC-205 [95] ou les récepteurs aux Fc des anticorps couplés aux antigènes. Une fois l'Ag capturé, les DC vont subir un phénomène complexe appelé maturation durant lequel elles vont acquérir une capacité accrue à présenter l'Ag et à migrer vers les tissus lymphoïdes. Durant la maturation, les DC vont exprimer une grande quantité de CMH et de molécules de co-stimulation indispensables à la présentation de l'Ag. De plus, elles vont également exprimer CCR7 qui est un récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21. L'expression de CCR7 par les DC va leur permettre de migrer par chimiotactisme vers les tissus lymphoïdes tels que la rate et les ganglions lymphatiques où elles vont terminer leur maturation [96] et produire des chimiokines afin d'attirer les LB et les LT [97]. Il est à noter que des DC spléniques activées par la présence d'Ag vont devoir migrer vers la zone marginale riche en LT [98]. La présentation de l'Ag par les DC va dépendre du type de LT. Classiquement, les DC présentent un Ag exogène *via* le CMH II aux LT CD4<sup>+</sup> qui seront alors polarisés en LT régulateurs (jouant un rôle dans la régulation de la RI) ou vers divers profils de LTh adaptés au pathogène. Cependant, plus rarement, les DC sont capables de réaliser une présentation croisée ou « cross-présentation » [99,100]. Cette dernière consiste à présenter un Ag exogène *via* le CMH I aux LT CD8<sup>+</sup> qui pourront ensuite éliminer la cellule infectée par le pathogène dont provient l'Ag.

Il est à noter que le processus de présentation antigénique est également impliqué dans la tolérance vis-à-vis du soi et peut donc avoir lieu constitutivement en absence de





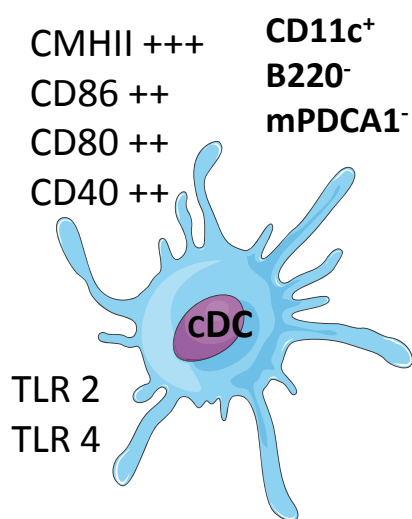
**Figure 8 : Schéma des principales étapes de différenciation des DC en cDC et pDC**

Au sein de la moelle osseuse, le progéniteur commun myéloïde (CMP) va se différencier en progéniteur commun aux monocytes/macrophages et aux DC (MDP). Une partie des MDP vont donner les monocytes tandis que le reste va donner le progéniteur commun aux DC (CDP). Les monocytes vont passer dans la circulation sanguine et pouvoir se différencier en macrophages s'ils infiltrer les tissus. Le CDP va quant à lui donner naissance aux pDC matures directement dans la moelle osseuse ou passer par un stade intermédiaire appelé préDC pour précurseur des DC. Les pDC matures ainsi que les préDC vont rejoindre la circulation sanguine. Les préDC vont alors migrer vers les organes lymphoïdes au sein desquels il vont donner naissance aux cDC matures. L'ensemble des cDC, pDC et macrophages pourront être localisés dans les organes périphériques lymphoïdes ou non lymphoïdes en tant que cellules résidentes.

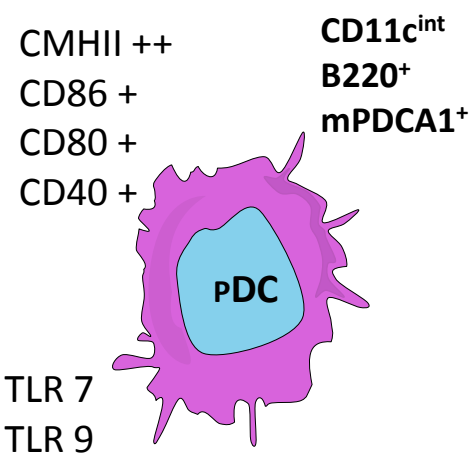
pathogène. En effet, les DC présentes partout dans l'organisme vont pouvoir capter les Ag du soi provenant de tissus spécialisés périphériques afin de les présenter, après migration, aux LT en cours de maturation dans le thymus. Dans ce contexte, il a notamment été montré que les DC étaient capables de présenter des peptides issus de cellules apoptotiques [101,102]. Pour cela, elles vont capter les Ag du soi issus de l'apoptose des cellules somatiques, exprimer CCR7 et migrer vers les ganglions lymphatiques [103,104]. Ainsi, les DC pourraient être capables de présenter de nombreux Ag du soi issus du renouvellement des cellules somatiques participant ainsi à l'élimination des LT auto-réactifs et donc à la prévention de l'apparition de maladies auto-immunes. Par conséquent, les DC se situent au carrefour entre RI innée et adaptative puisqu'elles sont capables de détecter le pathogène (PRR), de capter les Ag, de les présenter et de polariser les LT CD4<sup>+</sup> afin de mettre en place une réponse spécifique. De plus, les DC sont également au centre de ce qui est appelé la tolérance vis-à-vis du soi [105,106] et constituent par conséquent un type de cellules immunitaires essentiel pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme.

### *b) Différenciation et phénotype*

Les DC ne sont viables que durant quelques jours ce qui nécessite un renouvellement continu à partir de la moelle osseuse dans le but de maintenir leur nombre et de ne pas induire d'auto-immunité [107,108]. Les DC peuvent être subdivisées en deux sous-populations principales que sont les DC conventionnelles ou classiques (cDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). La différenciation et l'expansion des lignées spécifiques de DC sont contrôlées par des cytokines d'origine hématopoïétique dont les plus connues sont le ligand de Flt-3 (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand ; Flt-3L) et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) [109]. Pendant leur différenciation, les cDC et pDC vont acquérir les marqueurs spécifiques essentiels à leurs fonctions. Elles se développent (**Figure 8**) à partir de précurseurs exprimant les récepteurs au Flt-3L [110,111] et issus du progéniteur commun myéloïde (CMP). Le CMP va donner des progéniteurs communs aux monocytes/macrophages et aux DC appelés MDP [112]. Les MDP sont une population cellulaire hétérogène dont une partie va donner des cDC et des pDC et l'autre des macrophages [113]. En effet, la partie des MDP donnant des DC va d'abord passer par un stade intermédiaire appelé CDP (Common DC Progenitor) [114,115] qui exprime le récepteur au Flt3 (Flt3R<sup>+</sup>) et va se différencier en un précurseur à capacité restreinte (puisque ne



Production d'IL-12



Production d'IFN de type I

2 sous populations: CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>

**Figure 9 : Schéma des principales différences entre les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)**

Les DC sont constituées de 2 sous-populations, les cDC et les pDC, qui diffèrent par les niveaux d'expression de certains marqueurs tels que le CD11c, B220, mPDCA1, CMHII, CD86, CD80 et CD40. Elles expriment également différents types de TLR et différentes cytokines ce qui leur donne un rôle distinct mais complémentaire au sein de la réponse immunitaire.

pouvant donner que des DC) appelé préDC. Ce dernier va migrer vers les organes lymphoïdes où il va se différencier en cDC immatures sous l'influence du Flt-3L [114,115]. Les pDC vont quant à elles se différencier directement dans la moelle osseuse à partir des CDP, dépendamment du facteur de transcription E2-2 [116]. Il est cependant à noter que les pDC semblent provenir à la fois de la lignée lymphoïde et de la lignée myéloïde mais le précurseur lymphoïde des pDC n'a cependant pas encore été identifié de façon certaine [117].

Les DC représentent un système complexe composé de nombreuses sous-populations, ayant des fonctionnalités et des localisations différentes [118–120] et qui sont capables d'orienter la RI vers divers profils [121–123]. Chaque sous-population étant caractérisée par un ensemble de marqueurs qui va différer selon l'organisme étudié, les sous-populations de DC humaines ne sont par conséquent pas classées selon les mêmes marqueurs phénotypiques que les DC murines. Cette thèse portant sur les DC d'origine murine, nous décrivons donc les diverses sous-populations en utilisant la classification selon les marqueurs phénotypiques murins.

### *c) Les différentes sous-populations de DC murines*

Les DC murines peuvent être subdivisées en cDC et en pDC (**Figure 9**). Les cDC expriment fortement les marqueurs CD11c (une protéine transmembranaire de type intégrine) et CMHII et peuvent être séparées en 2 sous-populations principales [24] selon leur expression ou non de CD8 $\alpha$ . Les DC CD8 $\alpha^+$  sont localisées dans les zones riches en LT de la rate et des ganglions lymphatiques alors que les DC CD8 $\alpha^-$  sont localisées dans la zone marginale de la rate [124–126]. Il est à noter que leur développement dépend de facteurs de transcription différents et qu'elles sont capables d'induire des réponses différentes. En effet, il semblerait que les DC CD8 $\alpha^+$  induisent préférentiellement une réponse Th1 tandis que les DC CD8 $\alpha^-$  induiraient plutôt une réponse Th2. De plus, les CD8 $\alpha^+$  seraient plus efficaces pour réaliser la présentation croisée des Ag [127]. Les pDC quant à elles, expriment plus faiblement CD11c et sont caractérisées par l'expression d'autres marqueurs (e.g. mPDCA1 et B220) et la production de grandes quantités d'IFN de type I en réponse à une infection virale. Il est cependant à noter que l'expression de mPDCA1 et B220 n'est plus spécifique aux pDC en condition d'activation [128,129]. De plus, au sein des organes lymphoïdes, les cDC et pDC



peuvent également être caractérisées sur leur niveau d'expression du CMHII et des molécules de co-stimulation [130].

Notre projet s'intéresse particulièrement aux pDC et cDC spléniques murines ainsi qu'aux DC différenciées à partir de moelle osseuse (BMDC). Il faut savoir que les sous-populations décrites ci-dessus sont présentes dans la rate et les ganglions [131,132] et se développent toutes à partir de Flt-3L [133]. Néanmoins, il existe d'autres sous-populations de DC puisque, une fois différenciées, les DC migrent *via* la circulation partout dans l'organisme où elles vont jouer le rôle de sentinelles. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle elles sont souvent localisées au niveau de sites d'entrée des pathogènes (e.g. peau ; poumons ; intestins). Ainsi, la peau contient des sous-populations de DC classées différemment par rapport à ce qui a été décrit ci-dessus et selon le niveau de profondeur étudié. En effet, au niveau le plus périphérique, c'est-à-dire l'épiderme, nous allons retrouver les cellules de Langerhans tandis qu'au niveau du derme sera localisé un autre type de DC appelé DC dermale et pouvant être subdivisé en plusieurs sous-populations. Outre la peau, d'autres organes non lymphoïdes (e.g. lamina propria ou poumons) vont également abriter des sous-populations de DC classées cette fois-ci selon des marqueurs différents puisqu'elles présenteront un phénotype adapté à leur microenvironnement. Enfin, il est à noter qu'en plus de ces sous-populations observées à l'état basal, c'est-à-dire en absence de pathogènes, il existe d'autres sous-populations comme les DC inflammatoires appelées ainsi car elles vont se différencier à partir de monocytes mais uniquement en condition inflammatoire [134,135].

#### *d) Différenciation de DC in vitro*

Des modèles de différenciation *in vitro* ont été développés afin de palier la faible abondance de DC chez la souris et donc de faciliter leur étude. Deux approches sont bien décrites dans la littérature et utilisent les facteurs Flt-3L [125] ou une combinaison de GM-CSF et d'IL-3 ou 4 [109]. Pour ces deux modèles, des cellules de moelle osseuse sont incubées pendant 7 à 10 jours en présence de ces facteurs. Il a été montré que la différenciation utilisant la combinaison GM-CSF/IL-4 permet l'obtention majoritaire de cDC ayant un phénotype plutôt inflammatoire. Par contre, la différenciation des DC avec du Flt-3L permet d'obtenir des cDC et des pDC immatures [136]. Par conséquent, la différenciation de cellules dendritiques à partir de moelle osseuse, appelées BMDC, *via* un traitement au Flt-3L est préférable. En effet, elle permet d'étudier la fonction des DC *in vitro* puisque les cDC et pDC obtenues



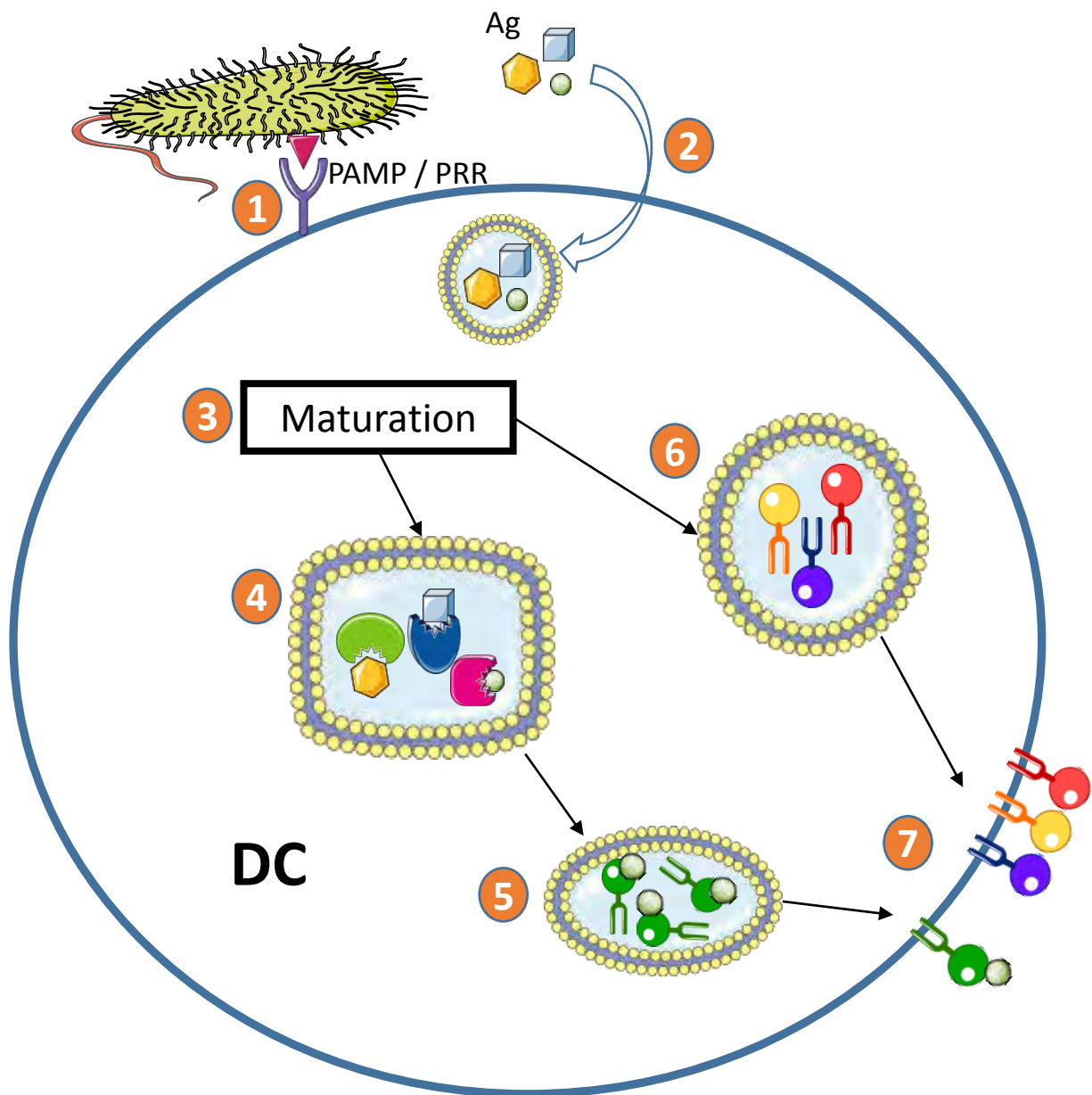
présentent une réponse cellulaire plus proche des conditions physiologiques par rapport à celle obtenues après différenciation au GM-CSF [137–139]. De plus, il a été montré qu'un traitement au Flt-3L stimulait la production de DC fonctionnelles *in vivo* [140]. Enfin, la différenciation de DC à partir de moelle osseuse permet l'obtention d'une grande proportion de pDC essentielles à la réponse antivirale mais également à la réponse adaptative à travers la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> [141]. Dans ce modèle, la maturation des DC différenciées à partir de moelle osseuse peut ensuite être induite par l'ajout de LPS afin de pouvoir étudier le phénotype basal ainsi que le phénotype activé/maturé des différentes sous-populations de BMDC.

### *e) Phénotype d'activation/maturation des DC*

#### **i. Phénotype immature des DC**

Une fois résidentes au sein des organes lymphoïdes et des tissus périphériques, les DC présentent un phénotype immature [24,142]. La première caractéristique des DC immatures est l'expression de divers PRR leur permettant de détecter un grand nombre de pathogènes différents [121,143,144]. Les DC possèdent des PRR (e.g. TLR (Toll like receptors), CLR (C-type lectin like receptors), RLR (retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors) et NLR (NOD-like receptors)) qui leur permettent de détecter les pathogènes [145–147]. Dans le cas des TLR, chaque sous-population de DC va exprimer un répertoire différent et la signalisation découlant de ceux-ci va également varier contribuant ainsi à leur spécialisation fonctionnelle [148]. Par exemple, les pDC expriment principalement les TLR-7 et -9 intracellulaires permettant la détection spécifique d'ARN et d'ADN non méthylé caractéristiques des virus expliquant ainsi leur spécialisation fonctionnelle antivirale [149]. Les cDC expriment quant à elles, majoritairement les TLR responsables de la détection des composants de la membrane/paroi bactérienne ainsi que des flagelles tels que les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 qui sont membranaires. Il est à noter que la détection du LPS est assurée spécifiquement par le TLR4. Tout comme les TLR, le répertoire de CLR varie également en fonction de la sous-population de DC considérée. Parmi les CLR peuvent être retrouvés DEC205 et les récepteurs DCIR (Dendritic Cell ImmunoReceptor) 1 et 2 qui sont impliqués dans le processus de présentation croisée [150–152]. Il est cependant à noter que, contrairement aux TLR, la fixation du ligand sur son CLR engendre généralement une diminution de la fonctionnalité des DC. Cette caractéristique pourrait venir du fait que de nombreux CLR ont pour ligands des molécules





**Figure 10 : Schéma des principales étapes de la maturation des DC**

(1) La reconnaissance d'un pathogène *via* l'interaction PAMP/PRR ainsi que (2) l'internalisation de l'Ag vont entraîner (3) la maturation des DC. L'Ag va alors subir (4) une protéolyse qui va générer des peptides et ces peptides vont être (5) couplés au CMHII. Les DC activées et matures vont également (6) produire les molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86) qui vont (7) être exprimées à la membrane avec les complexes CMHII/peptides.

exprimées par des cellules apoptotiques [153] et pourraient ainsi participer à l'induction de la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi en permettant leur présentation mais en limitant la maturation des DC afin qu'elles n'engendrent pas de réponse envers eux. Pour ce qui est des NLR et RLR, ils sont présents au niveau cytoplasmique, activent les voies et l'inflammasome [145,154–156] et sont par conséquent impliqués dans la réponse antivirale. La seconde caractéristique des DC immatures est leur capacité à capturer les Ag *via* des mécanismes faisant intervenir ou non des récepteurs [24,142]. Enfin, les DC immatures sont caractérisées par une faible expression du CMH II et des molécules de co-stimulation ce qui ne leur permet pas d'activer les LT et participerait ainsi à un état basal de tolérance du SI en absence de pathogène [24,142,157].

## ii. Phénomènes d'activation/maturation

Les DC présentes en périphérie sont phénotypiquement et fonctionnellement immatures en absence de pathogènes puisqu'elles maintiennent un niveau basal faible d'expression des molécules de co-stimulation [132,158,159] et ne sont, par conséquent, pas capables d'activer les LT [159]. A l'inverse, en présence de pathogènes, les DC vont s'activer (**Figure 10**) *via* la reconnaissance PAMP/PRR et vont également internaliser les Ag et les apprêter afin de les présenter. Au cours de l'activation des DC, l'Ag va subir une protéolyse (par acidification des vésicules) et les peptides en résultant vont être couplés au CMHII. Le complexe peptide/CMHII va ensuite être exprimé à la surface des DC [160,161]. Ainsi, l'activation des DC va entraîner un processus appelé maturation durant lequel elles vont exprimer les molécules de CMH liées à l'Ag ainsi que les molécules de co-stimulation telles que CD40, CD80 et CD86 [162–165] en quantité suffisante pour permettre l'activation des LT [166]. Il est à noter que les DC immatures maintiennent des réserves de CMHII [167,168] et d'enzymes [164,169] impliquées dans l'apprêtement de l'antigène et qui sont stockées dans des vésicules cytoplasmiques tandis que les molécules de co-stimulation sont produites durant la maturation [170]. La libération de ce stock de CMHII participe à la maturation des DC puisque la molécule « li », une chaperonne du CMHII permettant le chargement du peptide [171], module la migration des DC vers les ganglions lymphatiques. Ainsi, le stock de CMHII intracellulaire participe au rôle de sentinelle des DC non activées. De plus, il est à noter que l'activation des DC va également provoquer la diminution des molécules responsables de l'ubiquitination du CMHII (participant ainsi à son expression membranaire) et que ces molécules régulent également l'expression de CD86 (mais pas de CD80) [172,173].



Concernant CD40, cette molécule n'est pas synthétisée à l'avance contrairement au CMHII, mais son expression est induite par les signaux de maturation résultant de l'activation des DC.

Les molécules CMHII, CD40, CD80 et CD86, dont l'expression est augmentée après activation des DC, sont par conséquent appelées « marqueurs de maturation » et les DC les exprimant fortement sont considérées comme ayant un phénotype mature. Cependant, le phénotype mature d'une DC ne se limite pas à la seule expression de ces marqueurs mais également au fait qu'elles vont acquérir la capacité à migrer et à produire diverses cytokines selon le type de réponse à mettre en place. En effet, l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 va augmenter au cours de la maturation des DC [174,175]. Ce dernier est le récepteur de CCL19 qui est une chimiokine exprimée dans les zones riches en LT des ganglions lymphatiques ou de la rate [176] ce qui va provoquer le chimiotactisme des DC activées et matures vers ces zones où le contact DC/LT sera favorisé et permettra ainsi la présentation antigénique [104,177].

Lorsque l'ensemble de ces modifications sont mises en œuvre, les DC vont être capables de migrer, de présenter l'Ag, de produire des cytokines et par conséquent d'activer les LT. Elles sont donc considérées comme fonctionnellement matures [158,178]. A noter qu'une DC peut être phénotypiquement mature mais fonctionnellement immature si, par exemple, elle exprime les marqueurs de maturation mais ne produit pas l'ensemble des cytokines utile à sa fonction [178,179]. Un stimulus critique assurant le passage du stade phénotypiquement mature au stade fonctionnellement mature est la détection directe du pathogène *via* la fixation de l'Ag sur les PRR [178]. La liaison de l'Ag sur le TLR va par conséquent induire la maturation à la fois phénotypique et fonctionnelle des DC mais également moduler d'autres caractéristiques cellulaires (e.g. cytosquelette ; durée de vie de la cellule) [180–183].

### **iii. Régulation de la maturation/activation**

La maturation des DC ayant de grandes conséquences quant à la mise en place de la RI, ce phénomène complexe doit par conséquent être finement régulé afin d'éviter une réponse en absence de menace. Plusieurs acteurs vont jouer un rôle dans ces régulations et notamment i) les cytokines IL-6 et IL-10 ainsi que le facteur de transcription STAT3 associé à leur signalisation et ii) l'inhibiteur de signalisation cytokinique SOCS1. Pour commencer, nous allons nous intéresser aux axes IL-6/STAT3 et IL-10/STAT3. L'IL-10 a un rôle anti-inflammatoire bien connu tandis que l'IL-6 peut avoir une action pro- ou anti-inflammatoire



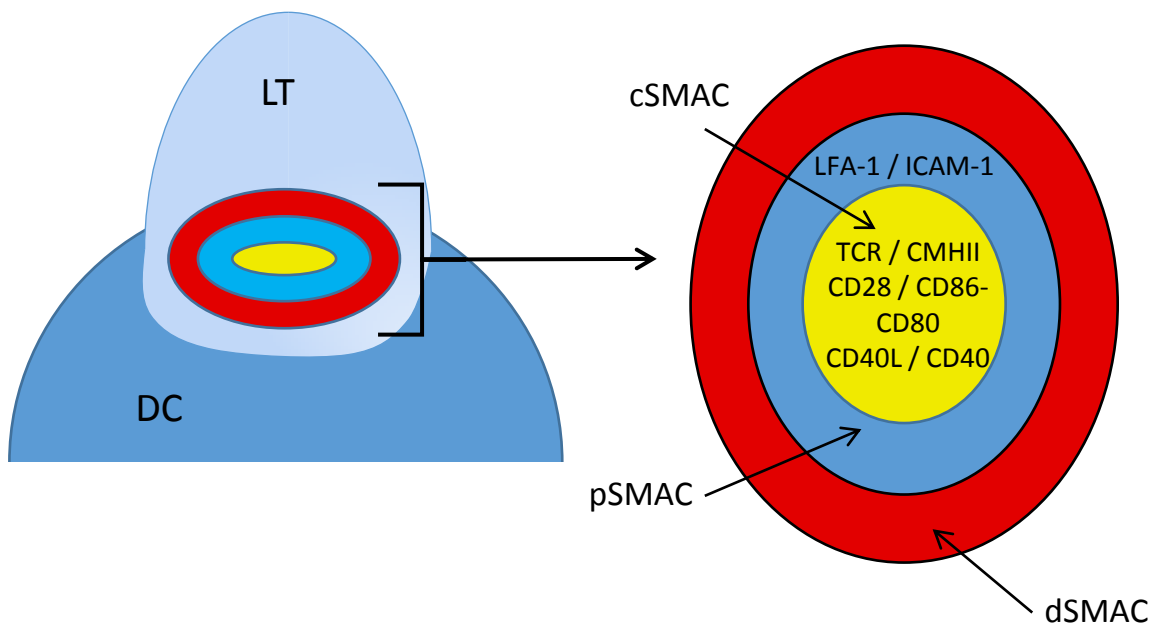
en fonction du contexte. En effet, son action pro-inflammatoire est connue dans un contexte infectieux mais il est à noter qu'en absence de pathogène, l'IL-6 semble avoir une action anti-inflammatoire sur les DC. Cette notion est supportée par le fait que des souris *Il6<sup>-/-</sup>* présentent des DC exprimant fortement le CMHII et CD86 de manière spontanée [184]. De plus, des DC n'exprimant plus STAT3 vont être très inflammatoires [185] mais ne seront pas phénotypiquement matures ce qui amène à penser que l'axe IL-10-STAT3 diminue la production de cytokines [186], tandis que l'axe IL6-STAT3 diminue l'expression de CMHII et CD86 par les DC [184,187,188]. Pour finir, SOCS1 (Suppressor of cytokine signaling-1) est un inhibiteur de plusieurs cascades de signalisation des cytokines [189] telles que l'IFN-I. Cette cytokine ayant un rôle important dans la maturation des cDCs et des pDCs en induisant l'expression des marqueurs de maturation [23,190], il semblerait par conséquent que SOCS1 permette aux DC de conserver un phénotype immature en absence de pathogène même si des cytokines pro-inflammatoires sont présentes. Cette régulation du phénotype de maturation des DC par SOCS1 permet d'éviter notamment le développement de maladies auto-immunes. De la même manière, la protéine A20 permettrait d'éviter que les DC ne murent en absence de pathogène en régulant de nombreuses cascades de signalisation impliquées dans la maturation des DC [191–194].

## *f) Fonctions des cellules dendritiques*

### **i. La présentation antigénique**

Les DC phénotypiquement et fonctionnellement matures ayant migrées vers les organes lymphoïdes vont devoir présenter l'Ag aux LT CD8<sup>+</sup> *via* le CMHI (cross présentation) ou aux LT CD4<sup>+</sup> *via* le CMHII. La présentation de l'Ag nécessite une interaction entre DC et LT qui vont entrer en contact de manière séquentielle pour former une structure particulière appelée synapse immunologique.

Dans un premier temps, la rencontre entre une DC et un LT est initiée par des mécanismes d'adhérence cellulaire indépendants de l'Ag. Cette étape permet au récepteur des LT, le TCR (T cell receptor), d'analyser la surface des DC dans le but de reconnaître un antigène spécifique. Lorsque le peptide approprié est reconnu par le TCR, différents mécanismes permettant la stabilisation d'un contact étroit entre les deux cellules se mettent en place. Cette étape, antigène dépendante, est associée à un élargissement de la zone de contact entre les deux cellules qui correspond à la formation de la synapse immunologique ou SMAC



**Figure 11 : Représentation schématique de la synapse immunologique**

Les cDC et pDC expriment le CMHII et les molécules de co-stimulation CD80/CD86 et CD40. Lors de la formation de la synapse, ces molécules vont s'apparier respectivement, au TCR, à CD28 et au CD40L présents sur les lymphocytes T (LT) pour former la zone centrale du complexe d'adhésion supra-moléculaire (cSMAC). La zone périphérique (pSMAC) va être formée par la liaison entre ICAM-1 (DC) et LFA-1 (LT naïf). Une 3<sup>ème</sup> zone, dite distale (dSMAC), assure un contact plus stable et prolongé entre la DC et le LT CD4<sup>+</sup>.

(Supra molecular adhesion complex) (**Figure 11**). La synapse immunologique est organisée en trois zones concentriques appelées cSMAC pour la zone centrale (central-SMAC), pSMAC pour la zone périphérique (peripheral-SMAC) et dSMAC pour la zone distale (distal-SMAC) [195,196]. La zone cSMAC est caractérisée par les liaisons TCR/CMHI ou II, CD28/CD86-CD80 et CD40L/CD40 pour LT/DC. La zone intermédiaire appelée pSMAC est caractérisée par les liaisons LFA-1/ICAM 1 pour LT/DC et la zone dSMAC est quant à elle composée de molécules plus diverses (e.g CD45).

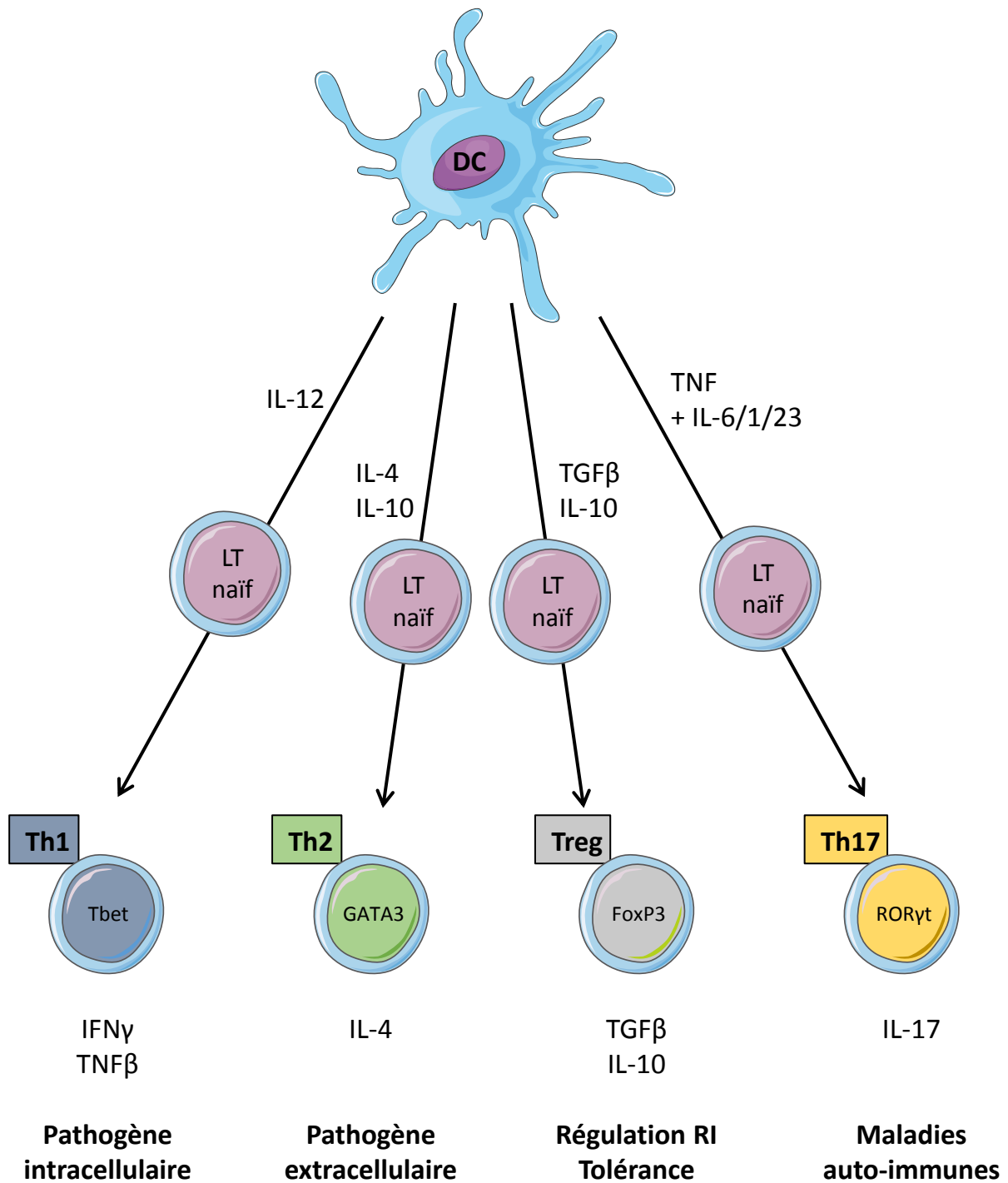
Cette structure stable va permettre l'activation des LT *via* les voies de signalisation du TCR et des molécules de co-stimulation. L'activation des LT CD4<sup>+</sup> requiert une séquence de trois signaux : la liaison du TCR (signal 1), la liaison de molécules de co-stimulation comme CD86 (signal 2) et enfin, la présence de cytokines telles que l'IL-2 (signal 3) [197–200]. De plus, la formation de la synapse immunologique requiert également une réorganisation du cytosquelette [201,202] essentielle à l'activation des LT [203,204]. La présentation de l'Ag (*via* la formation d'une synapse immunologique) ainsi que la production cytokinique des DC vont ainsi déterminer la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs vers différents profils présentés ci-dessous.

## ii. Polarisation des LT CD4<sup>+</sup>

Après décodage et intégration de l'information vis-à-vis du type d'antigène détecté suivie d'une maturation phénotypique et fonctionnelle, les DC vont mettre en place une réponse adaptée en stimulant les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques au peptide antigénique présenté [166]. Elles vont notamment sécréter un ensemble de cytokines qui vont permettre de polariser les LT CD4<sup>+</sup> naïfs vers différents profils : Th1, Th2, Th17 ou Treg [205–208] (**Figure 12**). Il est à noter que les cDC sont très efficaces pour mettre en œuvre cette polarisation des LT CD4<sup>+</sup> mais que les pDC, impliquées dans la réponse antivirale, sont également capables de polariser des réponses Th2, Th17 et Treg [209–211].

Les DC murines spléniques CD8α<sup>+</sup> secrètent de plus grandes quantités d'IL-12p70 par rapport aux DC CD8α<sup>-</sup> [126,212,213] et polarisent donc une réponse Th1 [119,120] (**Figure 9 et 12**). Les LT CD4<sup>+</sup> Th1 produisent à leur tour de l'IFN-γ (**Figure 12**) activant ainsi les macrophages et les cellules NK. A l'inverse, les DC CD8α<sup>-</sup> secrètent quant à elles une plus grande quantité d'IL-10 polarisant ainsi vers une réponse de type Th2 [214–216]. Les Th2 ainsi polarisés vont sécréter d'une part de l'IL-5 activant les éosinophiles et d'autre part, de l'IL-4 soutenant la production d'Ac appropriés par les LB (**Figure 12**). Il est cependant à noter qu'une réponse





**Figure 12 : Schéma de la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs par les DC**

La cellule dendritique va déterminer le devenir du LT naïf grâce à la sécrétion de diverses cytokines qui vont engendrer sa différenciation en LT CD4<sup>+</sup> (auxiliaires) de type 1 (Th1), 2 (Th2), 17 (Th17) ou régulateur (Treg). Chaque sous-type de LT CD4<sup>+</sup> va engendrer une réponse immunitaire adaptée à l'Ag présenté par la DC *via* la synapse immunologique.

de type Th2 peut également être induite par une sécrétion d'IL-4 [217] et que ces polarisations par des sous-populations de DC sont préférentielles et non pas exclusives [218]. En effet, l'orientation vers un profil préférentiel de Th par les DC dépend de nombreux facteurs, tels que les TLR exprimés ou les facteurs solubles présents dans le milieu (e.g. facteurs tissulaires ; cytokines) et peut donc être modulée [121,208]. Cette dernière notion est supportée par le fait que chaque sous-population de DC n'exprime pas un seul de type de PRR mais un répertoire ce qui leur permet de répondre à une variété de stimuli provenant de nombreux pathogènes différents et par conséquent d'induire plusieurs types de réponse.

#### ➤ *Polarisation Th1*

La cytokine la plus importante pour la mise en place d'une réponse Th1 est l'IL-12 [219,220] qui va être produite par les DC après activation de leur TLR et des cascades de signalisation en résultant [221]. L'IL-12 va agir sur les Th1 qui vont produire de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\beta$  (**Figure 12**). Les Th1 expriment le facteur de transcription T-bet [222] qui peut être également exprimé par les DC. Si tel est le cas, ces dernières vont être à même d'induire de manière optimale une réponse Th1 [223]. Les Th1 sont impliqués dans la protection contre des pathogènes intracellulaires (virus, bactéries) en agissant sur les macrophages et les cellules NK (Natural Killer) ainsi qu'en promouvant l'expansion des LTc (LT cytotoxiques) [224]. L'ensemble de ces effecteurs va permettre l'élimination des cellules infectées.

#### ➤ *Polarisation Th2*

La polarisation des Th2 par les DC est moins claire que pour celle des Th1 car elle semble être dépendante de nombreux facteurs tels que l'activation des PRR (notamment le TLR2) [225], la détection de certaines molécules et la coopération avec d'autres cellules du système immunitaire. En effet, une coopération entre DC et LB [226,227] mais également entre DC et basophiles [228] ont été montrées comme induisant une réponse Th2. Dans tous les cas, les cytokines induisant préférentiellement une réponse Th2 sont l'IL-4 et l'IL-10. Une fois polarisés, les Th2, dont le facteur de transcription signature est GATA-3, vont eux aussi sécréter de l'IL-4 et sont impliqués dans la protection contre des pathogènes extracellulaires (parasites, bactéries). Ils sont également impliqués dans les allergies puisqu'ils vont provoquer la production d'IgE par les plasmocytes qui eux-mêmes vont agir sur les éosinophiles permettant ainsi la destruction de parasites tels que les helminthes [224]. Une réponse excessive de type Th2 peut provoquer des allergies puisque les IgE vont



se fixer sur leurs récepteurs exprimés à la surface des basophiles et des mastocytes et induire la libération d'histamine [229].

#### ➤ *Polarisation Th17*

Les DC produisent les IL-6, IL-1, IL-23 ainsi que du TNF qui vont induire une polarisation de type Th17. Les Th17 produisent notamment les IL-21 et -22 mais également l'IL-17 d'après laquelle ils ont été nommés. Ils expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et sont responsables de l'orchestration d'une RI dirigée contre les mycètes et les bactéries extracellulaires, notamment au niveau des muqueuses, en agissant sur les neutrophiles ayant une action antimicrobienne [230].

De plus, les Th17 ont été montrés comme étant impliqués dans de nombreuses pathologies d'origine auto-immune telles que la sclérose en plaque, la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires chroniques des intestins comme la maladie de Crohn [231,232].

#### ➤ *Polarisation des Treg*

En plus de la mise en place d'une RI permettant au SI de se défendre contre une grande variété de pathogènes, les DC participent également à sa régulation en induisant la tolérance [157,233]. En effet, une déplétion *in vivo* des DC a montré un développement spontané de troubles auto-immuns dus à un défaut de tolérance au niveau des LT [234]. Comme cela a été indiqué plus haut, une grande majorité des DC présente un phénotype immature caractérisé par une faible expression du CMH et des molécules de co-stimulation ce qui induit une tolérance au niveau des LT qu'elles ne sont pas capables d'activer [157]. Ce phénomène de tolérance est assuré par les Treg qui sont polarisés par les DC tolérogènes. Les DC tolérogènes présentent un phénotype mature caractérisé par une augmentation de l'expression membranaire du CMHII et des molécules de co-stimulation. Cependant, ces DC ne sont pas fonctionnellement matures car elles ne produisent pas de cytokines pro-inflammatoires. De nombreux facteurs peuvent participer à l'apparition de DC tolérogènes comme la présence de cytokines anti-inflammatoires (e.g. IL-10 ou TGF- $\beta$ ) mais également d'autres médiateurs ayant eux aussi une action anti-inflammatoire (e.g. prostaglandine E2, divers dérivés métaboliques) [233,235]. Enfin, la localisation des DC dans l'organisme joue également un rôle, comme par exemple la muqueuse intestinale où les DC peuvent rencontrer des pathogènes mais également des micro-organismes commensaux [233]. La



flore commensale étant indispensable à l'organisme, les DC vont adopter un phénotype tolérogène afin de ne pas induire de RI contre celle-ci.

Ainsi, les Treg polarisés par les DC tolérogènes sont impliqués dans la régulation de la RI ainsi que dans les phénomènes de tolérance vis-à-vis du soi. Ils expriment le facteur de transcription FoxP3 et secrètent l'IL-10, l'IL-4 et le TGF- $\beta$ . Les Treg vont réguler les réponses de type Th1, Th2 et Th17 [236,237] et sont par conséquent indispensables puisqu'ils permettent de réguler l'inflammation (afin d'éviter la mise en place de réponses auto-immunes ou allergiques) et vont également être impliqués dans la tolérance vis-à-vis des Ag du soi.



## II. Le stress

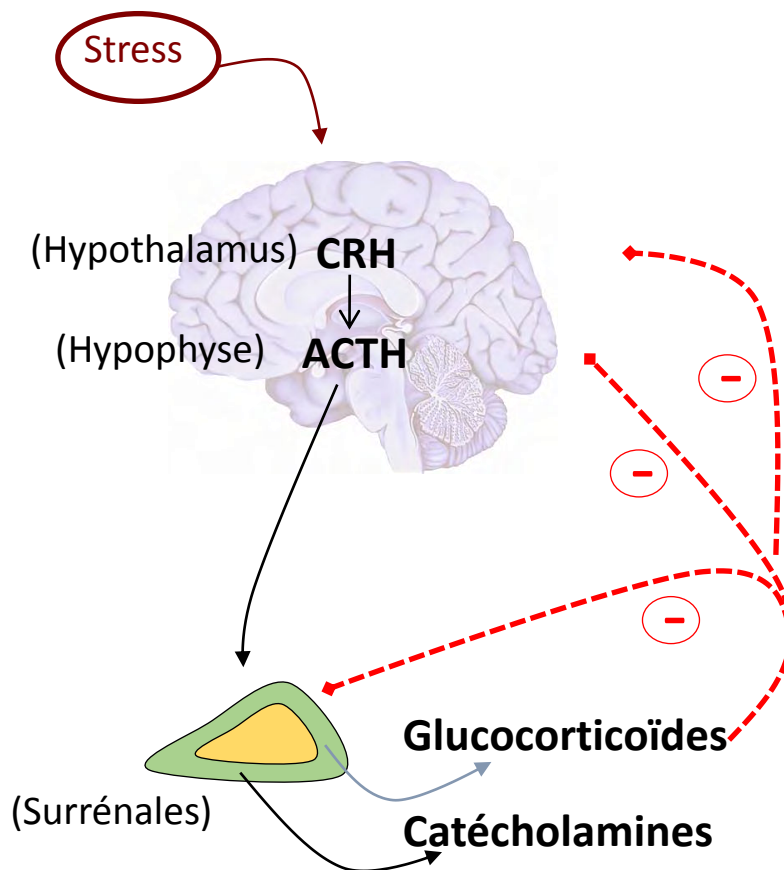
### A. Définition

Le stress peut être défini comme un changement environnemental interne ou externe perturbant l'homéostasie de l'organisme. D'un point de vue évolutif, la réponse au stress est bénéfique puisqu'elle permet la survie de l'organisme mais le stress peut également avoir des effets délétères selon sa nature, sa durée et l'individu lui-même. Il existe différents types de stress pouvant être subdivisés en deux catégories que sont les stress socio-environnementaux et les stress physiques. Les stress socio-environnementaux sont extrêmement nombreux et regroupent l'ensemble des stress pouvant être liés aux émotions comme par exemple les relations inter-individuelles, la vie en société, le travail ou encore différentes épreuves comme le développement d'une maladie. Les stress physiques quant à eux, regroupent par exemple le bruit, la pollution, les radiations ou encore les changements de gravité, de pression et de température.

Selon leur durée, les stress pourront également être considérés comme aigus ou chroniques. Le stress aigu correspond à un stress généralement intense et de courte durée (minutes à heures) tandis que le stress chronique correspond à des agressions intenses ou modérées qui vont pouvoir être soit de longue durée (jours/mois), soit de courte durée mais répétées à des intervalles de temps courts sur une longue durée. Le stress aigu est considéré comme bénéfique [238,239] alors que le stress chronique est associé à des effets délétères pour l'organisme. En effet, du fait de sa durée, le stress chronique va épuiser l'organisme favorisant ainsi la survenue de pathologies [240–242] comme des maladies mentales (dépressions, déficiences cognitives), des maladies cardiovasculaires ou encore le cancer [243]. De plus, le stress chronique impacte fortement le SI [244–246] soit en diminuant son efficacité, favorisant ainsi les infections ou les cancers, soit en l'exacerbant, favorisant ainsi l'apparition de pathologies comme les maladies auto-immunes.

Il existe une variation inter-individuelle importante concernant la perception et la résistance au stress [239,247]. En effet, cette variation de réponse de chaque individu face à un même type de stress semble être un mélange d'inné (génétique) et d'acquis (expériences vécues durant la vie de l'individu) en plus d'être influencée par les facteurs environnementaux [248–251]. Elle va notamment influencer la quantité et la durée de production des hormones de stress ce qui va avoir pour conséquence de moduler leurs effets notamment au





**Figure 13 : Présentation schématique de l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien (HHS) suite à un stress et de sa régulation**

La perception du stress au niveau cérébral entraîne l'activation de l'axe HHS menant à la sécrétion en cascade de la CRH (corticotropin-releasing hormone), de l'ACTH (adrénocorticotrophine) puis d'hormones de stress telles que les glucocorticoïdes. Ces derniers sont capables de réguler leur propre sécrétion en exerçant un rétrocontrôle négatif sur les glandes surrénales mais également l'hypothalamus et l'hypophyse.

niveau du SI (e.g. fonction et localisation des cellules du SI au sein de l'organisme) [245,252,253]. Malgré cette variation inter-individuelle, une réponse générale appelée « syndrome général d'adaptation », présentée ci-après, a cependant été décrite.

## **B. La réponse au stress : le syndrome général d'adaptation**

La réponse au stress est un processus complexe impliquant de nombreux systèmes tels que le système nerveux central (SNC), le système immunitaire, le système endocrinien et le système cardiovasculaire [254]. La détection d'un stress provoque l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) [255] menant notamment à la production de différents types d'hormones de stress par les glandes surrénales et par le système nerveux sympathique (SNS) (**Figure 13**). En effet, les glandes surrénales vont libérer du cortisol (humain) ou de la corticostérone (murin) tandis que le SNS va produire des catécholamines telles que la norépinéphrine (= noradrénaline) et l'épinéphrine (= adrénaline). Il est à noter que d'autres facteurs sont également impliqués dans la réponse au stress comme par exemple les cytokines [256] (e.g. IL-6 [257] et IL-1 $\beta$  [258]). De nombreux facteurs, en plus du type de stress et de sa durée, peuvent entrer en compte lors de l'étude des effets du stress sur l'organisme (e.g. étude *in vivo/in vitro* ; concentration hormonale physiologique/pharmacologique ; molécules endogène/synthétique). De plus, le sexe et l'âge de l'individu subissant le stress vont être des facteurs influençant de manière très importante les effets observés. Néanmoins, étant donné la grande diversité des hormones/facteurs produits en réponse au stress ainsi que des types cellulaires exprimant leurs récepteurs, il paraît évident que la réponse au stress est en mesure d'influencer l'ensemble de l'organisme. Cette réponse, appelée « syndrome général d'adaptation », est constituée de trois phases : la phase d'alarme, de résistance et d'épuisement décrites ci-dessous.

### **1) Stress aigu et chronique : la phase d'alarme**

Les quelques minutes suivant la détection du stress par le SNC constituent la phase d'alarme durant laquelle il va y avoir préparation des systèmes cardiovasculaire et musculo-squelettique. Les catécholamines, produites par le SNS en réponse au stress, sont responsables des modifications ayant lieu durant la phase d'alarme comme l'augmentation du rythme cardiaque, de la pression artérielle ainsi que du glucose et des acides gras libres circulants [259,260]. Elles vont ainsi permettre à l'individu subissant le stress de mettre en



place la réponse de « combat-fuite » [261,262]. Selon le type de stress, il pourra également y avoir modification du système immunitaire dans le but, par exemple, de préparer l'organisme à la survenue de blessures. Une amélioration des capacités cognitives de l'individu en réponse à un stress tel qu'un examen peut également être observée. La phase d'alarme a lieu à la fois en réponse à un stress de type chronique et à un stress de type aigu. Dans le cas d'un stress aigu cependant, elle sera suivie par un retour à l'homéostasie.

## **2) Stress chronique : les phases de résistance et d'épuisement**

Dans le cas d'une exposition à un stress de type chronique, le stimulus stressant va persister et il y aura mise en place de la phase de résistance durant laquelle l'organisme va puiser dans ses ressources afin de revenir à un état d'équilibre. Dans certains cas, selon l'individu ainsi que selon le type et la durée du stress, il va y avoir retour à l'homéostasie si le stress chronique se termine ou n'est plus perçu comme stressant. Par contre, si le stress persiste trop longtemps ou si l'individu n'est pas capable de le surmonter, il va alors y avoir mise en place de la phase d'épuisement due à une impossibilité de l'organisme à s'adapter.

La phase d'épuisement correspond à l'épuisement des réserves de l'individu et est marquée par une hyperactivité de l'axe HHS ce qui provoque une hypertrophie de l'hypophyse et des glandes surrénales. Cette hyperactivité mène à une sécrétion importante de cortisol mais également à d'autres troubles comme de l'hypertension et des changements immunitaires anormaux. Cette dernière phase du syndrome général d'adaptation à un stress chronique est par conséquent susceptible d'entraîner la survenue d'un état pathologique (e.g. anxiété ; dépression ; maladies auto-immunes) [243,263–265]. De manière intéressante, la perturbation du rythme circadien de production du cortisol chez l'Homme ou de la corticostérone chez la souris sont des marqueurs coïncidant avec les effets délétères du stress chronique [240,266,267]. Ainsi, le stress active l'axe HHS mais la réponse mise en place va pouvoir varier selon la durée du stress.

## **C. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien**

### **1) Activation de l'axe HHS**

Les stress physiques tels que les changements de pression et de température vont être détectés par des récepteurs spécifiques (mécaniques ou thermosensibles) présents en périphérie (ex : mécano et thermorécepteurs cutanés). Ces récepteurs vont émettre des signaux somatosensoriels acheminés jusqu'au SNC *via* des fibres nerveuses sensibles [268].



Les stress socio-environnementaux regroupent quant à eux l'ensemble des stress susceptibles de perturber l'état émotionnel de l'individu (e.g. isolement, pression sociale). La détection de ces stress est assurée par les organes sensoriels qui transmettent les informations au SNC *via* les innervations afférentes [269]. Au niveau du SNC, il existe un circuit neuronal composé de l'hippocampe, de l'amygdale et de certaines zones du cortex préfrontal. Ce circuit est appelé système limbique [269] et va permettre de réguler la réponse au stress qu'il soit physiologique ou comportemental. Une fois le stimulus intégré et qualifié comme stressant par le système limbique, l'hypothalamus va alors être stimulé et sécréter des catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine) qui vont permettre l'activation du système nerveux sympathique [270,271]. Outre la sécrétion de catécholamines permettant l'activation du système nerveux sympathique, l'hypothalamus va également être impliqué dans la phase de résistance en activant l'axe HHS (hypothalamo-hypophysio-surrénalien) comme cela a été indiqué plus haut.

## 2) Fonctionnement de l'axe HHS

En réponse à un stress, l'hypothalamus va produire de la CRH (corticotropin-releasing hormone) [272] qui va notamment se fixer au niveau de l'hypophyse et provoquer la sécrétion d'ACTH (Adrenocorticotropin hormone) dans la circulation systémique. Cette dernière va ensuite se fixer à ses récepteurs présents au niveau de la couche externe des glandes surrénales qui vont, à leur tour, produire des glucocorticoïdes (GC) dans la circulation sanguine (**Figure 13**).

Les GC circulants vont être susceptibles d'agir sur de nombreux types cellulaires en se fixant sur deux types de récepteurs nucléaires : les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR ou récepteur de type I) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR ou récepteur de type II). Ces deux types de récepteurs diffèrent par leur affinité aux GC ainsi que par leur distribution au sein de l'organisme impliquant ainsi des actions différentes. En effet, les MR sont principalement situés au niveau du système limbique et de l'hypothalamus alors que les GR sont présents à la fois au niveau du SNC et en périphérie [273–275]. Du point de vue de leur affinité, les GC ont une plus grande affinité pour les MR que pour les GR permettant ainsi aux GR de n'être stimulés qu'en cas de sécrétion importante de GC (e.g. stress, pic de production circadien) [276,277]. Lorsque les GC vont se lier aux GR cytosoliques, ceux-ci vont être transloqués dans le noyau où ils joueront le rôle de facteurs de transcription. En effet,



leur fixation à l'ADN, au niveau d'un promoteur GRE (glucocorticoid-response elements), permet la régulation de l'expression de gènes cibles impliqués dans des fonctions très variées (e.g. inflammation, prolifération, apoptose, transduction de signal) [278,279]. Lorsque le stimulus stressant ne sera plus détecté, le taux de GC reviendra ensuite rapidement à un taux basal afin de ne pas engendrer d'effets délétères pour l'organisme.

### 3) Régulation de l'axe HHS

Afin de réguler l'axe HHS et donc la production d'hormones de stress susceptibles d'avoir des effets délétères sur l'organisme, les GC vont agir à différents niveaux (**Figure 13**). Pour commencer, ils vont agir de manière indirecte au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse afin d'inhiber la sécrétion de CRH et d'ACTH provoquant ainsi une diminution de leur propre sécrétion par les glandes surrénales [255]. De plus, les GC peuvent également agir directement sur les glandes surrénales afin de diminuer leur propre sécrétion [278,279]. Le second niveau de régulation des GC est assuré par deux enzymes appelées 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénases de type 1 et de type 2 (11 $\beta$ -HSD1 et 11 $\beta$ -HSD2 respectivement). La 11 $\beta$ -HSD1 catalyse la transformation des formes inactives de GC, appelées 11-déhydrocorticostérone chez le rongeur et cortisone chez l'Homme, en formes actives (corticostérone ou cortisol respectivement). A l'inverse, la 11 $\beta$ -HSD2 catalyse la transformation des formes inactives en formes actives de GC [280]. Ces enzymes sont présentes au sein de nombreux organes et permettent ainsi de réguler localement l'action des GC. Les mécanismes de régulation des GC permettent ainsi d'éviter les effets délétères qui pourraient être engendrés par une exposition trop importante de l'organisme, tant au niveau quantitatif que temporel.

### 4) Dérégulation de l'axe HHS par le stress chronique

Si le stress est de type chronique, les mécanismes de rétrocontrôle présentés ci-dessus ne pourront pas se mettre en place et les GC vont alors avoir des effets néfastes tels que l'apparition d'un syndrome métabolique (hypertension, obésité abdominale, résistance à l'insuline) qui constitue lui-même un facteur de risque pour le système cardiovasculaire et pouvant aller jusqu'à induire un état dépressif [281]. Cette situation correspond à la phase d'épuisement du syndrome général d'adaptation. En effet, une élévation chronique du taux de glucocorticoïdes peut être observée en cas de traitement pharmacologique, de perturbations endocriniennes, de pathologies ou lorsque l'individu est exposé à un stress





chronique [282]. En fonction des stratégies d'adaptation mises en place par l'individu face à un stress chronique, l'activation et le fonctionnement de l'axe HHS peuvent être perturbés. En effet, en cas de stress chronique, il peut y avoir hypersécrétion de GC et absence de retour à un niveau basal dû à une désensibilisation des GR (récepteurs aux GC) provoquant une inhibition des mécanismes de rétrocontrôle [283,284]. Ces perturbations sont également accompagnées d'une augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  (ainsi que l'IFN- $\alpha$  et le TNF- $\alpha$ ) qui vont augmenter la sécrétion de GC. L'ensemble de ces modifications ont été observées dans la mise en place des dépressions résultant de stress chroniques [285–287].

#### **D. Stress rencontrés lors de vols spatiaux**

Au cours des vols spatiaux et des séjours dans l'ISS, les astronautes sont soumis à de nombreux stress. Tout d'abord des changements de gravité avec des phases aiguës d'hypergravité (décollage/retour sur Terre) et une phase chronique de microgravité. Ils sont également soumis à une perturbation du rythme circadien (dû au déplacement de l'ISS (16 orbites en 24h) et à l'éclairage de la station) ainsi qu'à un isolement et un confinement extrêmes. Enfin, bien que l'ISS se situe encore dans la magnétosphère, les astronautes subissent des doses de radiations plus élevées que sur Terre. Enfin, en plus des stress liés à l'environnement particulier de l'ISS, viennent s'ajouter ceux inhérents à la mission (phases de pilotage, sorties extravéhiculaires).

L'ensemble des stress rencontrés lors des vols spatiaux peuvent être regroupés au sein de deux catégories que sont les stress physiques (changements de gravité, radiations) et socio-environnementaux (perturbation du rythme circadien, isolement et confinement extrêmes). Nous nous intéresserons plus particulièrement aux radiations, aux changements de gravité et aux stress socio-environnementaux ci-après.

##### **1) Radiations**

Lors d'un vol spatial, les astronautes peuvent être exposés à différents types de radiations variant selon leur provenance [288]. Le premier type de radiation est le rayonnement cosmique qui est constant, provient de l'espace profond et se compose à 90% de protons, 9% d'hélium et 1% de particules lourdes à haute énergie. Le second type de radiation provient des éruptions solaires et il est par conséquent périodique et imprévisible. En plus d'avoir un effet direct sur les astronautes, ces deux types de radiations vont créer des



rayonnements secondaires lorsqu'ils vont percuter les parois d'un vaisseau avec suffisamment d'énergie.

Il faut savoir que le champ magnétique terrestre (magnétosphère) protège les occupants de la Terre et de l'ISS contre ces deux types de radiation mais elles vont cependant constituer un risque élevé pour la santé des astronautes lors des futures missions d'exploration de longues durées qui auront lieu hors de la magnétosphère (e.g. station lunaire, voyage vers Mars). Une augmentation de 3% du risque de décès dû aux radiations est la limite acceptable qui a été fixée (avec un risque alpha de 5%) [289]. Cependant, le risque encouru par les astronautes lors d'une mission sur Mars vis-à-vis de l'exposition aux radiations est difficile à évaluer puisque les chercheurs ne disposent pas de modèles de simulation ou de comparaison adéquats [290,291]. Ainsi, la seule pathologie associée aux radiations spatiales, connue à ce jour, est un risque plus élevé de développer une cataracte [292,293] mais ces études concernent majoritairement des astronautes ayant évolué au sein de la magnétosphère.

Il a été montré que les radiations peuvent avoir i) un effet direct sur les cellules en créant des lésions de l'ADN, mais également ii) un effet indirect en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'ensemble de ces altérations sont par conséquent susceptibles de participer à l'émergence de pathologies comme des cancers. De plus, une dose élevée de radiations est connue pour engendrer le syndrome aigu d'irradiation caractérisé par des nausées, des diarrhées et des vomissements [294]. Ce syndrome aboutit à des problèmes, cutanés et respiratoires mais également hématopoïétiques, pouvant être mortels. En effet, les cellules souches hématopoïétiques peuvent être affectées de manière directe par les radiations de type rayonnement cosmique mais également de manière indirecte lorsqu'elles sont cultivées en présence de cellules souches mésenchymateuses irradiées [295].

La composition complexe et le haut niveau d'énergie des rayonnements présents dans l'espace sont difficiles à simuler sur Terre puisque la majorité des faisceaux ne vont créer qu'un seul type de particule. Hors, les particules lourdes présentes dans le rayonnement cosmique sont caractérisées par un transfert linéique d'énergie supérieur aux radiations ionisantes présentes sur Terre (ex : rayons X et gamma) et transfèrent leur énergie tout au long de leur trajectoire (en créant des rayons delta secondaires) contrairement aux radiations ionisantes qui transfèrent leur énergie de manière uniforme au niveau tissulaire. Pour palier à ce problème, des simulateurs capables de créer des rayonnements dont la



composition s'approche de celle du rayonnement cosmique ont récemment été développés [296] et devraient fournir des données utiles pour l'évaluation des risques dus aux radiations. Toutefois, même si l'impact du rayonnement cosmique peut être simulé, il reste beaucoup plus difficile d'appréhender celui provenant des éruptions solaires et des rayonnements secondaires créés par les cloisons des navettes lorsque ces rayonnements les traversent. La nécessité d'effectuer des études au-delà de l'orbite terrestre basse (où la magnétosphère joue un rôle protecteur) est cruciale afin de déterminer le danger potentiel de futures missions d'exploration sur la santé des astronautes. Ces études seront possibles avec le développement de projets comme la station en orbite lunaire.

Pour conclure, le manque de connaissance et de modèles d'étude ainsi que l'imprévisibilité de certains événements ne permettent donc pas d'évaluer précisément les doses de radiations susceptibles d'être reçues par les astronautes en cours de mission hors de la magnétosphère ainsi que leurs effets sur la santé.

## **2) Socio-environnementaux**

L'environnement des astronautes est caractérisé par un isolement et un confinement extrêmes auxquels s'ajoute une privation sensorielle importante définie par la réduction des stimuli captés par un ou plusieurs sens. En effet, l'ensemble des sens (vue, audition, olfaction, touché et goût) ainsi que la perception du temps et des déplacements (kinesthésie) sont altérés notamment du fait de la microgravité et de l'environnement monotone des astronautes. La privation sensorielle, la monotonie et l'isolement social ressentis par les astronautes au cours de missions spatiales de longue durée proviennent de différentes sources. Ces dernières peuvent être la nourriture peu variée, l'odeur et le bruit constants des systèmes de circulation d'air mais également les rapports restreints entre individus dus au faible nombre/renouvellement de l'équipage et au contact minimal avec les proches restés sur Terre. Il est à noter que l'isolement social est susceptible de provoquer l'apparition de symptômes plus ou moins sérieux comme un sentiment de solitude mais également de l'anxiété, une paranoïa voire même le développement de symptômes dépressifs [297,298]. Bien que les probabilités d'apparition de tels symptômes soient très faibles du fait de la sélection et de l'entraînement des astronautes, le risque pourrait néanmoins croître au cours de mission où le retour rapide sur Terre sera techniquement impossible [299]. L'isolement et le confinement couplés à l'ensemble des privations



sensorielles vont ainsi créer un stress socio-environnemental chronique dont l'impact doit être évalué. Bien que le vol spatial soit un environnement particulier difficile à simuler, il est nécessaire de réaliser des études au sol afin de développer et de tester des contremesures. Dans cette optique, des expériences sur l'Homme ont été menées et un modèle de stress socio-environnemental sur la souris a été développé.

### *a) Modèles d'étude chez l'Homme*

Un premier modèle consiste à réaliser des missions en Antarctique [300–302] ou dans des laboratoires situés sous l'océan (NASA Extreme Environment Mission Operations ; NEEMO) en absence de synchroniseurs naturels du rythme circadien [303]. Les expériences de type NEEMO sont de très bons analogues d'un point de vue isolement et environnement puisqu'elles permettent de réaliser des sorties extravéhiculaires simulées mais la durée des missions est cependant limitée à quelques semaines du fait de la pression élevée. A l'inverse, les missions en Antarctique peuvent durer plus longtemps mais les lieux de vie ne sont pas aussi confinés que dans le cas d'un vaisseau spatial. Les résultats obtenus lors des missions utilisant ces analogues complémentaires ont permis de mettre en évidence que le manque d'ensoleillement, l'isolement social et la vie en espaces confinés constituaient des stress majeurs [304–306]. Concernant l'étude de l'impact de l'isolement grâce au modèle de missions en Antarctique, trois traits de caractères ont été utilisés pour la sélection des participants : compétence technique, stabilité émotionnelle et sociabilité [307]. Malgré cette sélection, les participants ont rapporté des troubles de l'humeur et du sommeil [307] ainsi que des tensions entre membres de l'équipe [308–310] corrélées à des altérations des performances cognitives [311]. L'ensemble des perturbations observées lors de périodes prolongées d'isolement dans l'Antarctique (sommeil, cognition, axe HHS, tensions interindividuelles [310,311]) s'aggravent durant la seconde moitié de la mission indépendamment de sa durée [304,307]. Bien entendu, ces problèmes d'ordre cognitif varient selon l'étude, l'équipe et le déroulement de la mission [311–313] et il est à noter qu'une supplémentation en hormones thyroïdiennes (lévothyroxine) ainsi qu'une exposition à une lumière artificielle forte présentent des effets bénéfiques [311,314].

Dans le but de simuler l'isolement rencontré par des astronautes lors d'une mission d'aller/retour sur Mars, le programme Mars 500 a été développé. Ce programme comporte des missions d'isolement de 105 et 520 jours sur six volontaires. Les résultats ont montré





une absence de stress, que ce soit au niveau subjectif (ressenti) ou au niveau de l'activation de l'axe HHS, après 105 jours d'isolement [315,316]. Après 520 jours par contre, l'activité de l'axe HHS était altérée comme le montre l'augmentation des taux salivaires de cortisol et de catécholamines [317–320]. Une diminution de l'activité corticale pouvant être liée aux privations sensorielles et au ressenti de la monotonie ainsi qu'une diminution de l'activité physique ont également été observées [317,321]. L'absence de lumière naturelle provoque également une perturbation du rythme circadien [322] indiquant que le respect d'un cycle jour/nuit et de l'alternance de phase de sommeil et d'activité sont essentiels [323–325]. Il est à noter que ces perturbations varient selon l'individu suggérant ainsi qu'il existe des prédispositions génétiques et/ou caractérielles [307] pouvant potentiellement être utilisées comme marqueurs de sélection ou de suivi des astronautes [326]. Des contremesures permettant de s'opposer à la privation sensorielle et à l'isolement social, telles que la réalité virtuelle [327], une nourriture variée et un espace personnel [328], ont été imaginées. L'ensemble de ces contremesures devront ainsi être combinées et intégrées aux missions de longue durée afin d'améliorer au maximum les conditions de vie des astronautes.

#### *b) Modèle d'étude chez la souris : Le CUMS*

Un modèle d'étude de l'impact des stress socio-environnementaux chez les rongeurs est appelé CUMS (Chronic Unpredictable Mild Stress ; CUMS) ou encore CMS (Chronic Mild Stress). Il faut savoir que de nombreuses études utilisent ce modèle de stress courts et répétés sur une longue durée mais qu'elles ne se réfèrent pas toutes au même nom (CMS/CUMS) et n'utilisent pas toutes la même procédure (type de stress). Il a notamment été montré qu'ajouter le terme « Unpredictable » était peu utile étant donné le fait que la plupart des études réalisées chez la souris utilisent un mode aléatoire d'exposition aux différents types de stress [329]. A l'inverse, il semble y avoir des différences au niveau de la sévérité des stress utilisés dans le protocole d'exposition des rongeurs, notamment au niveau de la privation de nourriture et/ou d'eau, et cette sévérité n'est pas corrélée au nom utilisé pour désigner la procédure [330]. Il est cependant à noter que la réglementation en expérimentation et en bien-être animal a engendré une diminution de l'utilisation de tels stress. Ainsi, nous utiliserons le terme CUMS tout en gardant à l'esprit qu'il peut correspondre au CMS.

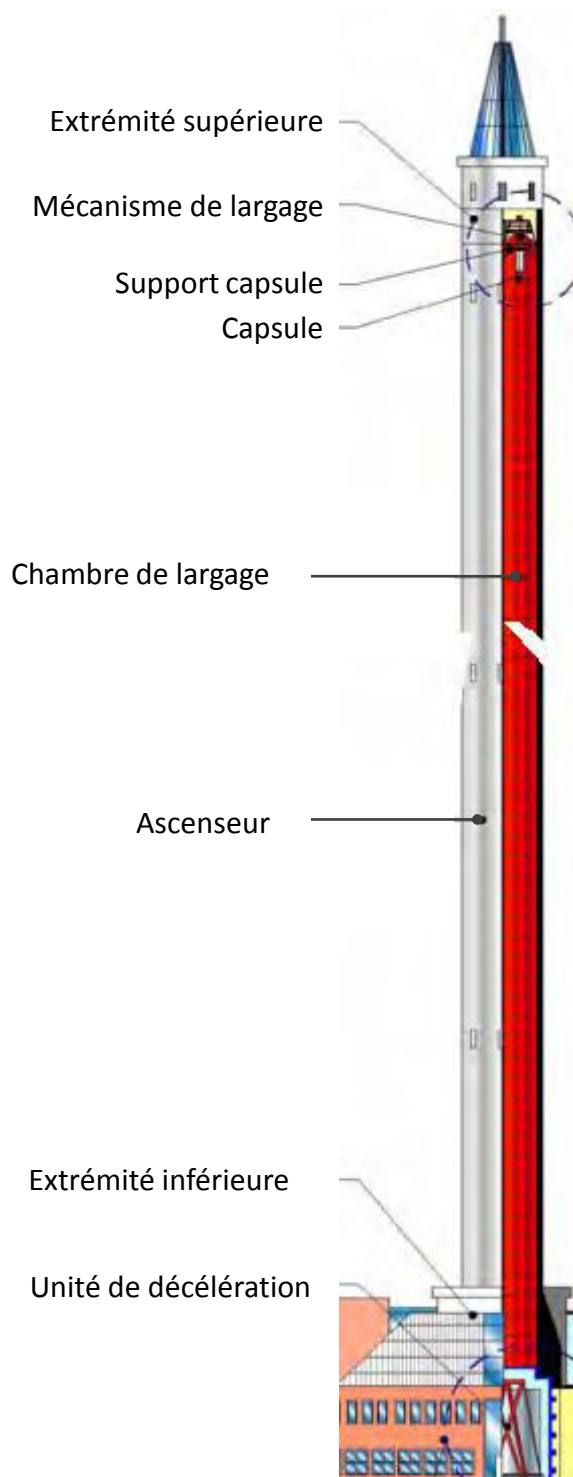
	Matin (1h)	Après-midi (2h)	Nuit 18h-9h
<b>Lundi</b>	Confinement	Inclinaison de la cage	Accès difficile à la nourriture
<b>Mardi</b>	Confinement	Cohabitation	Eclairage nocturne
<b>Mercredi</b>	Inclinaison de la cage	Confinement	Litière humide
<b>Jeudi</b>	Confinement	Cohabitation	Inclinaison de la cage
<b>Vendredi</b>	Confinement	Inclinaison de la cage	
<b>Week-end</b>	Cycle inversé		

**Tableau 2 : 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 souris sont soumises quotidiennement à différents types de stress socio-environnementaux de manière aléatoire au cours de la semaine afin d'éviter tout phénomène d'habituation. Ce protocole est répété 3 fois pour une durée totale de 21 jours d'exposition.

Bien que les noms et procédures diffèrent, le CUMS est très utilisé afin d'étudier la dépression engendrée par l'exposition à une combinaison de stress de courtes durées appliquée sur une longue période ce qui correspond donc à un stress chronique de type socio-environnemental [331,332]. En effet, le modèle CUMS est très efficace pour induire l'anhédonie chez le rongeur. L'anhédonie est le symptôme principal de la dépression et correspond à la diminution de la capacité à éprouver des émotions positives vis-à-vis de stimuli connus pour en avoir déclenchés auparavant. Chez le rongeur, ce symptôme est détecté par une diminution de la réponse à une récompense comme le test de préférence au sucre. Afin d'induire cet état, les stress les plus utilisés dans les procédures de CUMS ou CMS sont l'accès difficile à la nourriture, les modifications de cycle jour/nuit, la litière humide et l'inclinaison de la cage (**Tableau 2**). A l'origine ce protocole a été développé en s'appuyant sur l'ensemble des perturbations qui pourraient être causées par un animalier incompetent et négligeant telles que des biberons d'eau mal fermés engendrant une litière humide, un oubli d'apport d'eau et/ou de nourriture et un non respect des cycles d'éclairage de l'animalerie. Ce modèle a été très utilisé pour l'étude des effets du stress chronique, des mécanismes de la dépression et pour la validation de certains antidépresseurs [333,334] et inhibiteurs de l'axe HPA [335,336]. Il est à noter que des différences de résultats peuvent être observées dans la littérature [337]. Ces différences semblent être dues à des variations au niveau des protocoles de stress (types de stress utilisés, intensité et durée) et des tests d'évaluation de l'anhédonie (« sucrose preference »). De plus, le CMS ou CUMS engendre une hyperactivité de l'axe HHS qui peut être évaluée par une augmentation de la concentration en corticostérone dans le plasma [338,339] mais cette dernière n'est néanmoins pas observée dans d'autres études [340,341]. A noter que ces divergences pourraient être dues au fait que le dosage de la corticostérone n'a pas été réalisé au même moment alors qu'il varie selon l'implémentation de chaque stress durant la procédure. D'autres paramètres entrent également en jeu dans la reproductibilité des résultats comme l'utilisation de souches murines plus ou moins sensibles au stress, le sexe des animaux testés et les conditions d'hébergement.

Cependant, étant donné le fait que c'est un modèle fiable d'induction de troubles comportementaux (pouvant aller jusqu'à la dépression) en réponse à une combinaison de stress socio-environnementaux chez le rongeur, notre laboratoire l'a utilisé dans le contexte de la recherche spatiale (**Tableau 2**) [342,343]. Ce modèle nous permet de simuler l'impact



**Figure 14 : Schéma représentant une tour d'impesanteur ou « drop tower »**

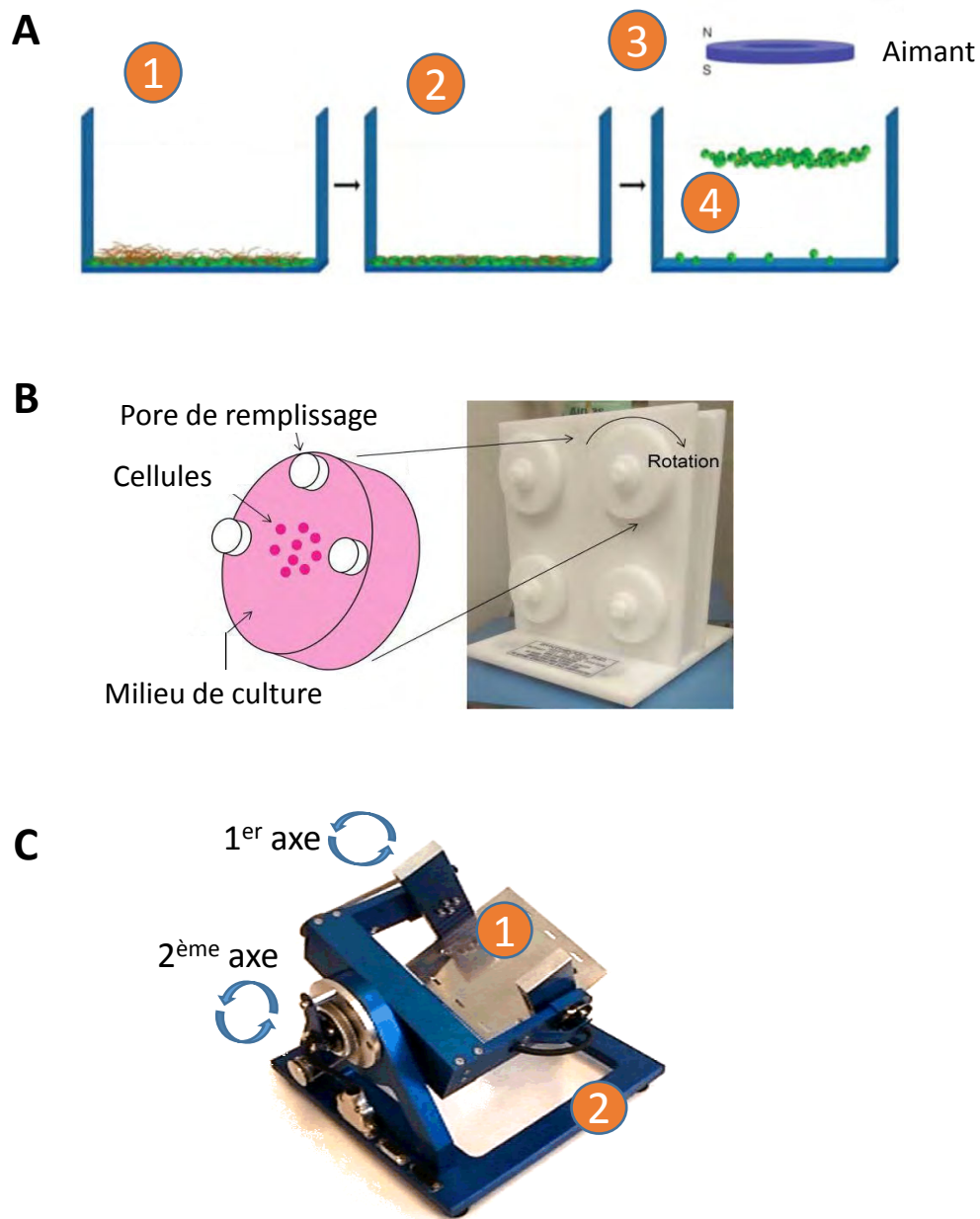
La capsule est larguée à partir de l'extrémité supérieure dans la chambre de largage qui a été préalablement vidée de toute atmosphère. Durant la chute, la capsule est donc en microgravité réelle durant quelques secondes (durée dépendante de la hauteur de la tour) puis elle est récupérée dans l'unité de décélération située à l'extrémité inférieure de la tour. (adaptée de <https://cadmos.cnes.fr/fr/web/CNES-fr/8804-drop-tower.php>)

que peut avoir une combinaison de stress socio-environnementaux ce qui correspond à la situation subie par les astronautes en vol.

### 3) Les changements de gravité

Au cours de leurs missions, les astronautes sont également soumis à des changements de gravité puisqu'ils vont subir des phases d'hypergravité lors du décollage et de l'atterrissage entrecoupées par une période de microgravité à bord de l'ISS. Cette dernière est due au fait que l'ISS, située à 400 km de la Terre, se déplace à une vitesse très élevée sur son orbite (16 révolutions en 24h) et est par conséquent continuellement en chute libre. Ainsi, à bord de l'ISS, les astronautes sont en chute libre à la même vitesse que la station d'où l'impression qu'ils « flottent » mais cela n'est pas dû à de l'apesanteur (absence de gravité) mais plutôt à de l'impesanteur c'est-à-dire à l'absence de gravité ressentie. Cette situation est appelée microgravité réelle.

La microgravité semble avoir un effet négatif sur la santé mais les études menées en vol, bien qu'indispensables à la validation de résultats, restent rares et les projets de recherche s'y déroulant sont coûteux et limités d'un point de vue technique. Ainsi il est nécessaire de développer des modèles terrestres de simulation de la microgravité. Cependant, il est impossible de recréer une microgravité réelle de longue durée telle qu'elle a lieu dans l'ISS et c'est pourquoi la plupart des dispositifs mis au point à ce jour utilisent le principe de redirection ou de compensation du vecteur gravitaire. Ces modèles permettent donc d'étudier les effets de la microgravité simulée. Le choix du modèle à utiliser dépendra du niveau d'étude (e.g. organisme entier ; cellule), de sa durée (e.g. secondes, minutes ou jours) et de l'espèce étudiée (e.g. Homme ; Rongeur). Il est également à noter que jusqu'ici, une fois leur mission terminée, les astronautes revenaient sur Terre et donc à une condition de normogravité ( $1g$  ou  $9,8 \text{ m/s}^2$ ) mais un second cas de figure doit maintenant être envisagé : le retour à une gravité partielle. En effet, avec le développement de projets visant la mise en place d'une station lunaire ou même de voyages sur Mars, les astronautes seront susceptibles d'être exposés à une gravité partielle durant des périodes plus ou moins étendues. En effet, par rapport à celle de la Terre ( $1g$ ), la force gravitaire est 6 fois moindre sur la Lune ( $0,17g$ ) et environ 3 fois moindre sur Mars ( $0,38g$ ). Ainsi, certains modèles d'étude des effets de la microgravité simulée ont été modifiés afin de s'intéresser à cette nouvelle problématique d'exposition à une gravité partielle.



**Figure 15 : Schémas représentant différents modèles de simulation de la microgravité**

(A) **Principales étapes du modèle de lévitation magnétique:** (1) Les cellules sont incubées avec un hydrogel magnétique contenant de l'oxyde de Fer puis, (2) les fragments d'hydrogel en excès sont lavés. (3) Un aimant est ensuite placé sur le couvercle de la culture cellulaire provoquant ainsi (4) sa lévitation dans le milieu de culture (Figure adaptée de Souza et al., 2010).

(B) **Modèle de clinostat 2D: le Rotating Wall Vessel (RWV)** (Figure adaptée de Higgison et al., 2016).

(C) **Photographie d'une Random Positioning Machine (RPM):** Les cultures cellulaires placées en RPM sont fixées sur le plateau (1) tandis que les cultures contrôle sont placées sur le cadre (2) afin d'être soumises aux mêmes conditions de vibration. Les cellules placées en (1) sont cultivées en microgravité simulée grâce à la rotation indépendante des deux axes dans des directions et des intervalles de temps aléatoires .

### *a) Les modèles de simulation de la microgravité simulée au niveau cellulaire*

La microgravité est définie comme étant la condition durant laquelle la somme des accélérations subies par le système n'excède pas une valeur seuil ( $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  g) [344]. Il existe différents modèles permettant de cultiver des cellules en condition de microgravité simulée. Ces modèles reposent sur des principes différents tels que la chute libre (**Figure 14**), la lévitation magnétique (**Figure 15A**) ou encore la réorientation du vecteur gravitaire (**Figure 15B et C**). Comme cela a été mentionné plus haut, une valeur de 0g ne peut être atteinte sur de longues périodes grâce à ces modèles ce qui justifie ainsi le terme de microgravité simulée. Comme tous les modèles de simulation, ils présentent des avantages et des inconvénients devant être pris en compte au moment de l'élaboration d'une étude portant sur les effets de la microgravité simulée.

#### **i. Les tours d'impesateur et les fusées-sondes**

Un premier modèle reposant sur le principe de chute libre est appelé « drop tower » ou tour d'impesateur (**Figure 14**). Ces dernières permettent d'étudier les effets d'une microgravité simulée par la chute libre c'est-à-dire de la même manière que pour les astronautes en vol. Cependant, la durée n'est que de quelques secondes seulement (2 à 10s selon la hauteur de la tour) et ce modèle est par conséquent plutôt utilisé pour le test de matériel.

Au niveau de la culture de cellules, les fusées-sondes sont un modèle d'étude permettant de simuler la microgravité durant plusieurs minutes en réalisant un vol parabolique [345–348] mais ce type de vol crée également des phases importantes d'hypergravité.

#### **ii. La lévitation magnétique**

La lévitation magnétique (**Figure 15A**) est un modèle permettant de simuler la microgravité en créant une force allant à l'encontre du vecteur gravitaire et permettant de compenser l'attraction terrestre. Il permet de réaliser la lévitation de cellules [349] mais également d'organismes [350,351]. De plus, ce modèle peut être utilisé non seulement pour simuler la microgravité [352] ou une gravité partielle [353], mais également pour réaliser de la culture de cellules en 3D [354,355].

Contrairement à la plupart des autres modèles de simulation de la microgravité, la lévitation magnétique pourrait être couplée à de l'imagerie en temps réel. Cependant, elle peut toutefois entraîner des interactions non souhaitées avec des composants cellulaires susceptibles au magnétisme tels que la tubuline, l'actine ou l'ADN [356,357]. Ainsi, les





résultats obtenus lors d'études utilisant le modèle de lévitation magnétique sont à prendre en compte avec précaution.

### iii. Les clinostats

#### ➤ *Fonctionnement et terminologie*

Ce modèle utilise la réorientation du vecteur gravitaire grâce à la rotation d'un ou plusieurs axes dans le but de simuler la microgravité (**Figure 15B et C**). Lorsqu'elles sont cultivées dans ces clinostats, les cellules vont tout d'abord décrire des cercles dont le diamètre va décroître au fur et à mesure du temps aboutissant au final à des déplacements d'amplitude négligeable [358]. Lorsque ces conditions sont atteintes, les échantillons ne sont plus influencés par la gravité et sont donc considérés comme étant en microgravité simulée. Plusieurs études comparant les effets créés par une culture en condition de microgravité simulée par lévitation magnétique, par clinostat ou en vol, ont montré que le modèle de clinostat devait être préféré par rapport à celui de la lévitation magnétique et ce pour les cellules adhérentes et cultivées en suspension [359]. Il est à noter que le modèle de clinostat permet également de valider des modèles d'expérience et/ou de réaliser un screening avant de passer à une étude en vol c'est-à-dire en microgravité réelle. L'ensemble de ces avantages ont fait que nous avons choisi le clinostat de type RPM comme modèle d'étude pour ce travail de thèse.

Il existe des clinostats tournant sur un axe de rotation et qui sont appelés clinostats 2D (**Figure 15B**). Un second type de clinostats comportant deux axes de rotation est appelé clinostats 3D si la vitesse et la direction de rotation des deux axes sont constantes [358,360]. A l'inverse, si la rotation des deux axes est paramétrée pour se faire dans des directions et à des vitesses angulaires aléatoires, le dispositif est alors appelé RPM (Random Positioning Machine) (**Figure 15C**) [361,362]. C'est ce dernier modèle, la RPM, que nous avons utilisé.

#### ➤ *La Random Positioning Machine (RPM)*

La RPM (**Figure 15C**) est utilisée afin d'examiner les effets de la microgravité simulée se mettant en place durant des périodes de l'ordre de l'heure et a été développée pour rentrer dans un incubateur pour culture cellulaire (desktop RPM) [363]. Elle est considérée comme étant un bon modèle d'étude des effets de la microgravité simulée sur cultures cellulaires [364]. Les conditions classiques d'utilisation de la RPM sont une vitesse angulaire moyenne de 60 deg/sec et le placement des échantillons à une distance du centre permettant de se



maintenir à une valeur inférieure à  $10^{-3}g$  [362]. Plusieurs paramètres sont susceptibles de perturber la simulation de la microgravité comme la présence de bulles, le phénomène de convection et les vibrations. Par conséquent des précautions doivent être prises afin de limiter leurs influences. Tout d'abord, l'apparition de bulles dans les cultures cellulaires doit être limitée au maximum. Ensuite, le phénomène de convection, dû à la rotation des axes et non retrouvé en vol, doit être réduit grâce à la sélection d'un intervalle de variation de la vitesse angulaire le plus faible possible [365]. Enfin, l'influence des vibrations (dus aux mouvements de la RPM) sur les cultures de cellules doit être prise en compte en plaçant les cultures contrôles dans les mêmes conditions.

Pour finir, des améliorations du système de RPM ont été récemment apportées dans le but de simuler différents niveaux de gravité partielle en développant d'une part, de nouveaux logiciels de contrôle [366] ou d'autre part, un nouveau modèle de RPM appelé RPM 2.0 (Defence and Space Netherlands).

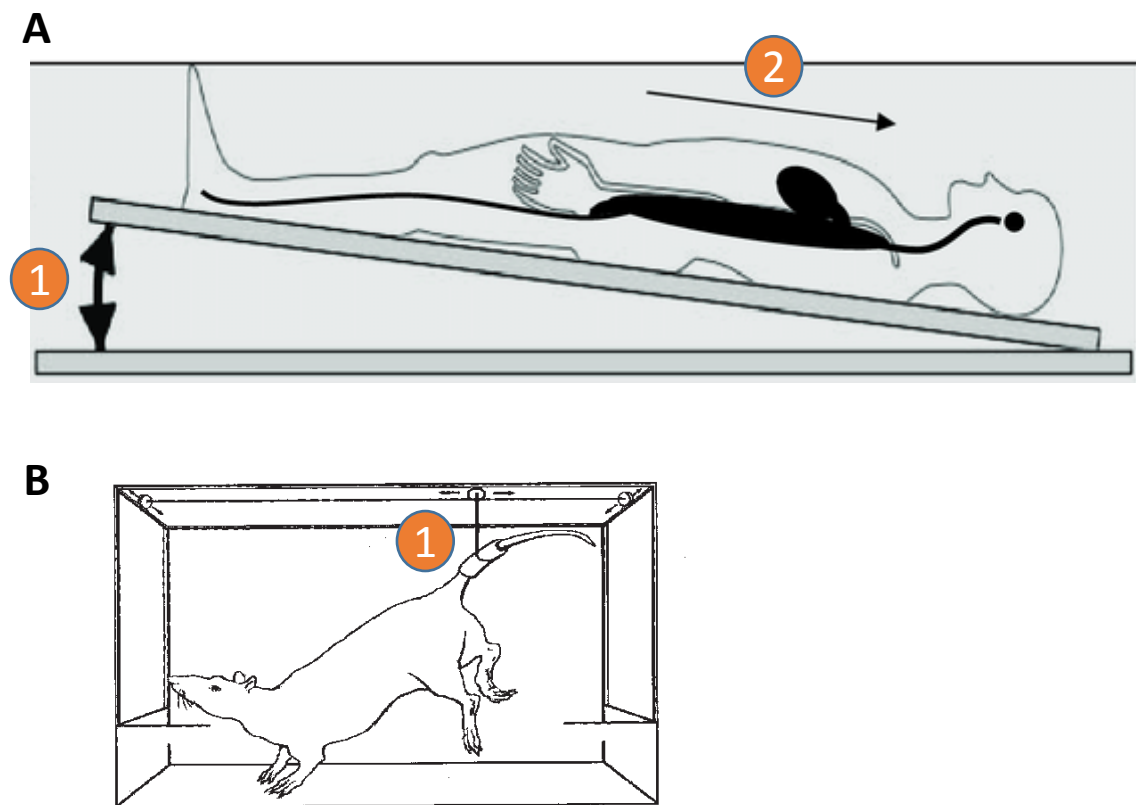
### *b) Les modèles de simulation de la microgravité au niveau de l'organisme entier*

Outre les modèles de simulation de la microgravité à l'échelle de la cellule, il existe des modèles permettant l'étude d'organismes entiers. Ces modèles peuvent être subdivisés en deux sous-catégories : la première regroupant les modèles simulant effectivement la microgravité et la seconde catégorie regroupant les modèles simulant certains effets observés en microgravité réelle.

#### **i. Le vol parabolique : un modèle d'étude simulant la microgravité**

Le vol parabolique utilise le principe de chute libre ce qui en fait un bon modèle de simulation de la microgravité rencontrée dans l'ISS. Les autres principaux avantages de ce modèle sont un accès relativement facile et un coût réduit par rapport aux vols spatiaux. Toutefois, ce modèle est caractérisé par une période de microgravité est courte (25s) entrecoupée de phases d'hypergravité ce qui constitue son principal inconvénient.

Le vol parabolique est principalement utilisé pour tester différents appareils devant être utilisés au cours de vols spatiaux ainsi que pour étudier les effets de la microgravité sur le système vestibulaire. En effet, une désorientation spatiale proche du « mal des transports » peut survenir en condition de gravité altérée. Cette désorientation pose problème puisque son apparition est corrélée avec les phases où l'attention des astronautes doit être maximale



**Figure 16 : Schémas représentant différents modèles de simulation de la microgravité**

(A) **Modèle d'alitement prolongé « Bed Rest »** : les sujets sont placés en position allongée et inclinés (1) de 6° vers l'arrière durant de longues périodes (semaines/mois) afin de provoquer (2) une redistribution des fluides vers la tête (d'après Blottner et al., 2006).

(B) **Modèle de suspension anti-orthostatique «Hindlimb Unloading (HU)»** : Les souris sont (1) attachées par la queue et suspendues avec une inclinaison d'environ 30° entre le tronc et le fond de la cage créant ainsi une redistribution des fluides vers la tête (d'après Litvinova et al., 2003).

(e.g. manœuvres du vaisseau après une période de microgravité longue). La sélection des astronautes, basée sur leur susceptibilité à de telles désorientations, peut ainsi être réalisée grâce aux vols paraboliques [367]. Il a notamment été montré que la perception de l'orientation et du mouvement dans une situation de gravité altérée requiert à la fois des signaux provenant des otolithes (concrétions minérales de l'oreille interne) mais également des signaux extérieurs visuels servant de référentiel [368].

En plus de l'étude du système vestibulaire, les vols paraboliques permettent de s'intéresser à tout autre changement ayant lieu rapidement comme par exemple les altérations de baroréflexes [369,370] et la redistribution des fluides vers la tête [371,372]. Les vols paraboliques ont également été utilisés pour tester des procédures médicales et chirurgicales [373] telles que le contrôle des fluides [374], les méthodes d'attache des instruments, du patient et des médecins (posant problème en situation de microgravité) [375] et le développement des capacités à mettre en œuvre des mouvements précis en microgravité [376]. Les vols paraboliques permettent également de tester différents niveaux de gravité partielle comme ceux de la Lune ou de Mars [377–379]. Enfin, le vol parabolique va devenir un modèle de choix afin de tester et de développer les futurs vols suborbitaux commerciaux qui seront empruntés par des personnes moins entraînées que des astronautes [380,381].

## ii. Les modèles d'étude simulant les effets de la microgravité

En plus des modèles présentés ci-avant, il existe des modèles simulant les effets de la microgravité plutôt que la microgravité elle-même. Les deux effets majeurs observés en condition de vol et qui sont simulés par ces modèles sont la réduction de l'utilisation des membres postérieurs et l'induction d'une redistribution des fluides vers la tête. Sur ces principes, de nombreux modèles adaptés à l'Homme et aux rongeurs, ont été développés. Les deux principaux sont présentés ci-après (**Figure 16**).

### ➤ *Chez l'Homme : Le modèle d'alitement prolongé « Bed rest »*

Dans ce modèle (**Figure 16A**), les sujets sont immobilisés en position allongée et inclinés de 6° vers l'arrière durant de longues périodes (semaines/mois) afin de provoquer une redistribution des fluides vers la tête. Il est cependant à noter que les individus sont toujours soumis à la gravité ce qui crée une compression en position allongée provoquant ainsi une



redistribution des fluides différente de celle observée en microgravité réelle. Néanmoins, le vecteur gravitaire étant redirigé vers la poitrine et l'arrière du corps plutôt que vers les pieds (grâce à l'inclinaison des lits), les variations de pression artérielle se rapprochent des conditions de vol. De plus, il y a bien une absence de charge au niveau des membres postérieurs qui est similaire aux conditions de vol.

Ce modèle est principalement utilisé afin d'étudier les systèmes cardiovasculaire et musculo-squelettique. En effet, les astronautes subissent un déconditionnement cardiaque [382,383] ainsi que des pertes osseuses [384] et musculaires [385,386] importantes durant et après les vols spatiaux. L'utilisation du modèle « Bed Rest » permet de recréer ces altérations. En effet, le « Bed Rest » provoque des pertes osseuses localisées au niveau des sites supportant les charges dès 47 jours et qui empirent au cours du temps [387,388]. La plupart des études ont montré que ces pertes osseuses étaient liées à une augmentation de l'activité des ostéoclastes [389,390]. Une expérience « Bed Rest » de 60 à 90 jours suffit à recréer les détériorations osseuses observées après un vol spatial de 6 mois [391] et de la même manière que pour les vols spatiaux, la récupération de la perte osseuse est très longue [392]. De plus, la structure de l'os étant importante pour l'hématopoïèse, ces pertes osseuses pourraient être à l'origine d'altérations du SI (Projet en cours au laboratoire). Des altérations au niveau musculaire ont également été observées chez des astronautes en vol [386] et de manière similaire chez des rongeurs exposés à la microgravité réelle ou simulée [393–395]. Le modèle Bed Rest est très utile afin d'étudier les modifications musculaires engendrées par la microgravité car, tout comme les pertes osseuses, elles apparaissent très rapidement (10 à 15 jours) [396,397].

Le modèle « Bed Rest » présente de nombreux avantages. Vis-à-vis de la microgravité, il permet de réaliser des mesures longitudinales plus facilement qu'en vol et sur des effectifs plus importants. De plus, le modèle « Bed-Rest » a également des applications sociétales puisqu'il permet l'étude de l'ostéoporose provoquée par ce modèle et qui se rapproche de celle liée à l'âge tout en apparaissant plus vite [398]. Il est donc très utilisé afin d'étudier les pertes osseuses causées par le vieillissement. Le fait d'utiliser le « Bed Rest » présente également d'autres avantages tels que l'étude directe de l'Homme et la possibilité de tester des contremesures permettant de lutter contre les pertes osseuses et musculaires telles que des supplémentations [399,400], des exercices physiques [401–403] ou encore la restauration d'une gravité grâce à l'utilisation de centrifugeuses [392].





➤ *Chez le rongeur : Le modèle HU*

Le modèle HU (Hindlimb Unloading) (**Figure 16B**), aussi appelé modèle de suspension anti-orthostatique, est le modèle de référence permettant de simuler les effets de la microgravité sur des rongeurs. En effet, des résultats comparables ont été obtenus entre rongeurs exposés aux conditions de vol spatial réelles et ceux exposés au modèle HU [404,405]. Ce modèle permet de recréer la redistribution des fluides vers la tête ainsi que l'hypokinésie des membres postérieurs grâce à une suspension par la queue. Concernant l'étude des effets de la microgravité simulée cependant, la principale faiblesse de ce modèle provient du fait que les membres supérieurs subissent la gravité contrairement aux conditions de vol réel. Toutefois, l'avantage majeur de ce modèle est qu'il permet d'étudier l'influence d'autres types de stress (e.g. infections, radiations) en plus de celui de la suspension ce qui serait difficile et trop rare en vol réel. De plus, il permet également d'étudier la capacité de récupération des animaux. Enfin, en plus d'être un modèle d'étude des effets de la microgravité simulée, il peut également être utilisé afin d'évaluer l'influence des comportements sédentaires sur la survenue de nombreuses maladies chroniques telles que l'obésité, le diabète ou les maladies cardiovasculaires [406–409].



### III. Effets du stress et des vols spatiaux sur le SI

#### A. Généralités

Les vols spatiaux sont susceptibles de devenir accessibles à un public de plus en plus large du fait du développement à venir des vols commerciaux [410]. Cependant, dans l'espace, les astronautes sont soumis à une combinaison unique de stress comme la microgravité, les radiations, la perturbation du rythme circadien et l'isolement/confinement. Bien qu'ils semblent s'adapter à des durées de vol allant jusqu'à un an, de nombreuses altérations impactant différents systèmes ont été observées. Ces altérations pourraient affecter les performances des astronautes et ressemblent à celles observées lors du vieillissement puisqu'elles touchent notamment le SI, les os, les muscles, la vision, la coordination et le système cardiovasculaire [398,411]. En effet, les vols spatiaux entraînent une atrophie musculaire couplée à une déminéralisation osseuse [385,386,412], un déconditionnement cardiovasculaire [413] et métabolique [414,415], une altération des processus cognitifs [416,417] et une diminution de l'efficacité du SI [418–420]. Sur Terre, ces changements surviennent sur de longues périodes lorsqu'ils sont observés dans la population générale alors qu'ils sont détectés après seulement quelques semaines (e.g. déconditionnement cardiovasculaire) ou quelques mois (e.g. perturbations osseuses et musculaires) de vol chez les astronautes qui sont pourtant des individus sains, sélectionnés et très entraînés. Les changements observés en vol ayant lieu plus rapidement que sur Terre [398], cela permettrait donc d'envisager les vols spatiaux comme étant un bon modèle d'étude du vieillissement. L'étude des effets des vols spatiaux et le développement de contremesures s'y opposant présentent par conséquent un intérêt à la fois pour le maintien de la santé des astronautes mais également de la population générale souffrant des mêmes symptômes.

De plus, il a également été montré que les vols spatiaux provoquaient une diminution des capacités de l'organisme à se réparer et à se régénérer et que cela était dû à une dérégulation de la fonction des cellules souches [421,422]. A la suite de cela, la recherche conduite en condition microgravitaire a ouvert la voie à des applications très intéressantes que sont l'ingénierie des tissus [423] et la thérapie cellulaire. En effet, la culture de cellules en condition microgravitaire permet de développer des interactions cellulaires en 3D afin de former des tissus ou des organes qui pourraient, à terme, être utilisés en recherche (pharmacocinétique) ou en chirurgie (greffe) et présenter de nombreux avantages tels que la



lutte contre le vieillissement et le manque de donneur. Enfin, au niveau de la thérapie cellulaire, il a été montré que la microgravité permettait le maintien de différents types de cellules souches [424–427].

Ainsi, les effets des vols spatiaux en général et de la microgravité en particulier étaient à l'origine étudiés afin de développer des contremesures pour le maintien de la santé des astronautes. A ce jour cependant, ces études se sont avérées avoir un fort intérêt sociétal puisque des applications ont été découvertes dans les domaines du vieillissement, de la thérapie cellulaire, de la cristallisation de protéines [428] et de la culture cellulaire en 3D [429,430] pour l'ingénierie des tissus. Il est par conséquent nécessaire de poursuivre les recherches concernant les effets des stress liés aux vols spatiaux et notamment leur impact sur le système immunitaire. En effet, ces recherches permettront non seulement de maintenir la santé des astronautes en vol mais pourraient également, de la même manière que pour les autres thématiques citées ci-dessus, aboutir à des applications au niveau sociétal. Dans cette partie, nous décrirons tout d'abord les effets du stress sur le SI pour ensuite nous intéresser plus particulièrement à l'impact des stress liés aux vols spatiaux (socio-environnementaux, radiations et microgravité).

## **B. Effets du stress sur le SI**

### **1) Modulation des effets du stress selon sa durée**

Le stress peut avoir des effets différents sur le SI selon sa durée [240]. En effet, un stress aigu est considéré comme ayant un effet plutôt pro-inflammatoire et bénéfique en provoquant une libération transitoire d'hormones de stress suivie d'un retour à la normale. A l'inverse, un stress chronique semble avoir des conséquences délétères [239,240,244,431] puisqu'il va provoquer une augmentation dérégulée des hormones de stress et ainsi avoir plutôt des effets anti-inflammatoires [432,433]. Ces différences entre stress aigu et stress chronique sont dues notamment aux variations de quantité d'hormones de stress produites et plus particulièrement de GC. En effet, ces derniers vont pouvoir se fixer à deux types de récepteurs différents ayant une affinité et une localisation précise ce qui va provoquer des effets variables au niveau de l'organisme (**cf. partie II.C.2.**) [276].

De plus, la modulation du SI par le stress n'est pas uniquement médiée par les GC puisqu'elle peut être observée chez des rongeurs ayant subi une ablation des glandes surrénales [434]. La CRH, des neurotransmetteurs (e.g. norépinephrine) et neuropeptides (e.g. ;



neuropeptide Y et neurotensine) sont donc également impliqués [435,436]. En effet, le stress, qu'il soit aigu ou chronique, active l'axe HHS ainsi que le système nerveux sympathique et la majorité des cellules du SI expriment des récepteurs aux hormones de stress produites. De plus, les organes lymphoïdes primaires et secondaires sont innervés par le SNS qui produit les catécholamines [437,438].

Ainsi, le stress peut potentiellement influencer à la fois le développement mais également la maturation et la réponse des cellules du SI. Plusieurs variables telles que le type de stress, sa durée et l'individu touché vont moduler les effets observés [240,439]. En retour, le SI peut moduler le SNC et le système endocrinien notamment *via* la production de cytokines pro-inflammatoires [440].

#### *a) Impact du stress aigu sur le SI*

Un stress aigu a été montré comme induisant une redistribution des leucocytes circulants [441] à la fois chez l'Homme [442] et chez la souris [443]. Ce trafic sera bénéfique en cas de besoin d'une immuno-protection comme par exemple au cours d'une infection. En effet, une redistribution des cellules du SI aurait pour but de relocaliser ces dernières au niveau des sites potentiels d'infection tels que la peau, les muqueuses ou les ganglions lymphatiques [240,244,245,441]. Il est également à noter que l'effet inverse peut être observé notamment sur les cellules NK [444] et les neutrophiles [445,446] dont la fonction est diminuée en réponse au stress aigu.

Une augmentation de l'efficacité du SI en réponse à un stress de courte durée a été montrée chez le rat comme étant majoritairement due aux hormones de stress telles que la corticostérone et l'épinéphrine [447]. Cependant, en plus de ces hormones, une augmentation de la quantité de certaines cytokines, telles que l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  circulantes, participe également à l'augmentation de la capacité de défense du SI par le stress aigu [256–258,448]. Toutefois, les effets pro-inflammatoires d'un stress aigu peuvent également s'avérer être délétères dans un contexte allergique ou auto-immun [238,244,449]. En effet, si l'individu subissant le stress souffre de maladies auto-immunes (e.g. psoriasis, arthrite, sclérose en plaque) ou d'autres maladies étant influencées par le SI (e.g. dermatite, maladie cardio-vasculaire), un stress aigu pourra avoir des effets délétères pour l'organisme [450–452].





### *b) Impact du stress chronique sur le SI*

Dans le cas d'un stress chronique, des effets généralement délétères vont être observés. En effet, chez certains individus, le retour à l'homéostasie ne pourra jamais avoir lieu si le stress est de longue durée ou si les répétitions sont trop rapprochées. Cela va engendrer des perturbations du rythme circadien de production des hormones de stress [240] mais également du sommeil et du comportement de l'individu. Ainsi, le stress chronique est connu pour augmenter la susceptibilité aux infections virales ou bactériennes [453–457], accélérer le vieillissement du SI [458] et participer à l'apparition de symptômes dépressifs et à la diminution des capacités cognitives [459] de l'individu.

La prolifération des LT est affectée par de nombreux types de stress comme le développement de maladies [460–462], les examens [463,464] ou encore les relations interindividuelles [465–467]. Cela pourrait être dû à une diminution de l'IL-2 et de son récepteur [468,469] (nécessaires à la prolifération, à l'activation et à la fonction des LT) qui ont été observées en réponse à des stress chroniques. Un stress chronique sera donc généralement considéré comme immunosuppresseur [240,470,471] mais il peut également entraîner un changement de production cytokinique d'un profil Th1 à un profil Th2 avec la participation de l'IL-10 impliquée dans les allergies et les maladies auto-immunes [472].

De plus, il a été montré que le stress chronique pouvait impacter de nombreux processus tels que la vaccination [468,473] et la cicatrisation [474–476] et pouvait également être lié à l'apparition de cancers en influençant les processus de réparation de l'ADN [477,478].

Il est à noter que les cellules NK sont impliquées dans la défense de l'organisme vis-à-vis des cellules infectées ou en cours de transformation tumorale. De manière intéressante, ces cellules peuvent être différemment impactées par le stress. En effet, il a notamment été montré qu'un stress aigu pouvait augmenter le nombre et la cytotoxicité des cellules NK [463] mais que d'autres modèles de stress, majoritairement chroniques, provoquaient une diminution de l'efficacité de ces cellules [465,479–484] participant ainsi à la réactivation de virus latents et au développement de cancers. De plus, des études portant sur l'exposition à des hormones de stress, dont la production est dérégulée durant un stress chronique, ont également montré un lien avec l'apparition de métastases [485,486]. Enfin, des études *in vitro* ont confirmé que les hormones de stress telles que les GC, l'ACTH et la CRH pouvaient entraîner une réactivation de virus latents [487,488]. Cette dernière a été observée en réponse à différents types de stress chroniques [489,490] et notamment des stress de type



socio-environnementaux tels que ceux liés à la profession [491], au mariage [466,467,492] ou encore aux examens [493,494].

Pour finir, le stress a également un impact sur la production de cytokines par les cellules du SI. Les cytokines sont des médiateurs solubles (**cf. partie I.B.5.**) pouvant entraîner une réduction de l'activité physique, de l'appétit et des interactions sociales, ainsi qu'une augmentation de la somnolence et de l'anhédonie [495,496]. Il a notamment été montré qu'un stress psychologique chronique pouvait moduler la production de cytokines et que le SI, en retour, participait ainsi à la régulation de l'état émotionnel d'un individu [496–501]. Pour cela, le SI produit des cytokines qui vont pouvoir agir au niveau du SNC (*via* le nerf vague ou en passant la barrière hémato-encéphalique) [502,503] et contrôler notamment l'humeur et les émotions [504]. De plus, certains types cellulaires présents dans le SNC (e.g. microglie, astrocytes, cellules endothéliales) ont été montrés comme exprimant de nombreux récepteurs aux cytokines et comme étant capables de produire ces dernières [505,506].

L'ensemble des perturbations du SI présentées ci-avant peuvent être liées aux hormones de stress (e.g. GC, catécholamines) et il faut savoir que de nombreuses cellules telles que les lymphocytes, les neutrophiles et les macrophages expriment des récepteurs pour ces hormones [507–510].

## 2) Effets des hormones de stress sur les cellules du SI

### a) Généralités

Le stress provoque l'augmentation des niveaux d'adrénaline et de noradrénaline circulantes ayant un impact variable, en fonction du type et de la durée du stress, sur la fonction du SI [511,512] et notamment des lymphocytes, des monocytes et des macrophages exprimant leurs récepteurs. De plus, l'innervation des organes lymphoïdes comme la moelle osseuse par le SNS va être en mesure de moduler la différenciation et la production de leucocytes *via* la production de catécholamines [513–515]. En effet, les catécholamines vont généralement avoir un effet immunosuppresseur en diminuant la fonction de ces cellules et cela a été confirmé par des expériences d'ablation du SNS provoquant de nombreuses altérations du SI [516] et une augmentation de l'apparition de maladies auto-immunes [517–520].

Le stress provoque également la production de GC qui inhibent la fonction des macrophages et des lymphocytes ainsi que leurs migrations. Concernant les lymphocytes B, responsables



de la production d'Ac, le stress a été montré comme pouvant moduler le type d'immunoglobuline produite [480,489,521]. Au niveau des lymphocytes, il a été montré que le stress peut entraîner une diminution à la fois des LT totaux [464] et notamment des LT CD4<sup>+</sup> [481]. Il peut également entraîner une diminution de la prolifération des LT mémoires [491,522] et impacter l'activation et la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> [479,489] *via* à la fois les GC et les catécholamines [523,524].

Le stress en général et les GC en particulier sont également connus pour induire un changement de production cytokinique d'un profil Th1 à un profil Th2 en diminuant la production d'IFN $\gamma$  et en augmentant celle de l'IL-10 [525,526].

De manière générale, les hormones de stress et particulièrement les GC inhibent la production de cytokines [527–529] et d'autres médiateurs pro-inflammatoires dans de nombreux tissus [433,530] tout en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires [531–533]. En effet, les leucocytes exprimant les récepteurs aux GC vont produire moins de cytokines pro-inflammatoires [534,535]. Cependant, des cas particuliers peuvent être observés notamment concernant l'IL-6 qui est une cytokine pro-inflammatoire pouvant être induite par des hormones de stress [525]. Ainsi, le stress peut provoquer une augmentation de l'IL-6 pro-inflammatoire dans le plasma [474,536–538] qui a elle-même été liée au développement de dépressions [536,539].

### *b) Impact des hormones de stress sur les DC*

Le stress aigu a été montré comme étant bénéfique pour la fonctionnalité des DC avec une augmentation de leur maturation, de leur migration à partir de la peau vers les ganglions lymphatiques [540–542] et de leur efficacité à activer les LT [543,544]. Cependant, l'étude des effets des hormones de stress a montré un fort impact délétère sur le phénotype et la fonction des DC. En effet, les catécholamines ont été montrées comme diminuant la fonction des cellules de Langerhans (DC présentes dans la peau ; **cf. partie I.C.2.c.**) [545] notamment en provoquant une baisse de la production d'IL-12 et ainsi une inhibition de la polarisation vers un profil Th1 [546,547] ce qui favorise la réponse de type Th2 [548] dont nous avons parlé ci-avant (**cf. partie III.B.2.b.**). Les catécholamines sont également susceptibles de réduire les capacités d'apprêtement [545] et de présentation [549] de l'Ag, ainsi que de stimulation des LT [550] par les DC. De la même manière, concernant les GC, des études ont montré un effet inhibiteur de ces derniers sur la fonction des DC [551,552]. En effet,



l'administration orale ou topique de GC provoque une réduction du nombre de pDC circulantes [553] et de cellules de Langerhans [554] respectivement. L'influence de la dexaméthasone (corticoïde de synthèse) sur le développement et la fonction des DC a également été beaucoup étudiée. Une diminution de la viabilité des DC présentes dans la peau [555,556], la rate et les ganglions lymphatiques [557,558] a notamment été mise en évidence ainsi qu'une diminution de leur migration vers les ganglions lymphatiques [559]. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec d'autres études montrant une diminution de l'expression membranaire des marqueurs d'activation/maturation des DC [558,560,561]. En effet, les GC limitent la capacité d'interaction des DC avec les LT en empêchant l'augmentation de l'expression du CMHII et des molécules de co-stimulation telles que CD86 [562]. De plus, la dexaméthasone diminue la capacité des DC à présenter l'Ag [558] et à stimuler les LT [555,563–565]. De manière intéressante, les DC exposées à la dexaméthasone sont également incapables de mûrir et induisent une réponse de type Treg mais il est à noter que cet effet n'a plus lieu après activation des DC au LPS [563]. Cela met en évidence l'effet différentiel que peuvent avoir les GC sur les DC selon le stade de maturation de ces dernières. Concernant les cytokines, une baisse de la sécrétion d'IL-1, d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  par les DC traitées aux GC a été observée [560]. Ces cytokines étant impliquées dans la survie et la maturation des DC, leurs diminutions participent donc aux altérations de maturation et de fonction citées ci-avant [566].

## **C. Impact des vols spatiaux sur le SI**

### **1) Généralités**

Les effets des vols spatiaux sur la RI n'ont été que très peu étudiés chez l'Homme mais il a été montré que de nombreux paramètres étaient affectés. Concernant l'immunité humorale, l'utilisation de modèles animaux de type amphibien a montré que les vols spatiaux affectaient le répertoire d'anticorps [567] avec une baisse de la fréquence des mutations hypersomatiques indiquant que la réponse humorale pourrait être moins efficace en vol. De plus, cette impact sur les Ac pourrait également altérer la lymphopoïèse [568] ce qui a été confirmé chez la souris à la fois au niveau des LT et des LB en utilisant des modèles d'hypergravité et de microgravité simulée par suspension anti-orthostatique [569,570]. Des études menées sur des équipes d'astronautes, directement après retour de missions, ont montré une altération de la production de cytokines [571]. En effet, une diminution des





cytokines de type Th1 est observée en vol ce qui contribuerait à la diminution de l'immunité innée et suggérerait un changement vers un profil d'expression de type Th2 [419]. Cette polarisation vers un profil cytokinique de type Th2 représente un risque puisqu'elle participe aux allergies et aux hypersensibilités [572,573] du fait de la diminution de l'immunité médiée par les cellules. En effet, certains astronautes ont montré des symptômes allergiques et d'hypersensibilité cutanée en vol [572].

Un changement de distribution de leucocytes [574] et une diminution de l'efficacité des NK [575,576], des lymphocytes [577] et de la RI médiée par les cellules en général [578,579] ont également été observés chez des astronautes. De plus, ces derniers semblent être sujets aux infections avant, pendant et après leurs vols puisque près de la moitié de ceux ayant participé à des missions de 6 mois à bord de l'ISS ont souffert de troubles immunologiques notables [573]. Une autre étude plus ancienne avait également montré que 15 des 29 astronautes ayant participé aux missions Apollo ont contracté des infections virales ou bactériennes soit durant le vol, soit durant la semaine suivant leur retour sur Terre [580]. Enfin, des réactivations de virus latents tel que le virus Epstein-Barr ont été observées chez de nombreux astronautes [581]. Des perturbations du SI ont souvent été mises en évidence au retour sur Terre mais d'autres études ont montré qu'elles avaient lieu en vol et n'étaient donc pas dépendantes de l'atterrissage et de la réadaptation à l'environnement Terrestre [582,583].

L'ensemble de ces données suggère que les vols spatiaux provoquent une diminution de l'efficacité du SI menant à des altérations qui pourraient constituer un risque majeur notamment pour les futures missions de longue durée au cours desquelles, un retour sur Terre ne sera pas possible et où les moyens thérapeutiques seront limités [584,585].

## **2) Effet des différents types de stress rencontrés lors des vols spatiaux**

Nombre des altérations du SI observées en vol et présentées ci-dessus pourraient être dues aux hormones de stress [418,586] et notamment la diminution de la RI [584,587,588]. En effet, une redistribution des leucocytes a été observée en vol [574] ainsi qu'en réponse à un stress [441,442]. De la même manière, la réactivation des virus latents peut être observée en réponse à un stress [489,490], à des hormones de stress [487,488] et en vol [581] (**cf. Parties III.B.b. et III.C.1.**). De plus, une polarisation d'un profil Th1 vers un profil Th2 a également été observée en réponse à un stress [472,525,526] ainsi qu'en vol [419]. Il existe par



conséquent de nombreuses similarités entre les effets du stress sur Terre et les vols spatiaux vis-à-vis du SI avec une tendance générale à la baisse d'efficacité. En effet, les astronautes sont soumis à de nombreux stress de type physique durant leurs missions (e.g. changements de gravité, radiations) mais ils subissent également des stress de type socio-environnementaux (e.g. isolement, sorties extravéhiculaires, confinement, perturbations du rythme circadien, relations entre membres de l'équipe). Tous ces stress sont susceptibles de provoquer la libération d'hormones de stress qui va être modulée selon l'individu touché et les caractéristiques de la mission (e.g. dangerosité, durée, charge de travail, entente au sein de l'équipe). Ainsi, la variation inter-individuelle de production des hormones de stress pourrait participer aux variations observées au niveau des effets des vols spatiaux sur le SI des astronautes. Il est par conséquent important de garder à l'esprit que les altérations observées au niveau du SI des astronautes sont causées par la combinaison de l'ensemble des stress rencontrés en vol [418,575,579,589–591]. Cependant, l'environnement spatial étant unique et très complexe, les chercheurs se voient souvent dans l'obligation d'étudier les effets de chaque type de stress individuellement. Nous allons par conséquent présenter ci-après les effets des principaux stress rencontrés au cours des vols spatiaux par les astronautes sur le SI et qui sont : les radiations, les stress socio-environnementaux et les changements de gravité.

#### *a) Les radiations*

Bien qu'une exposition à de faibles doses de radiations semble avoir un effet positif sur le SI (Hormèse) [592], les doses reçues par les astronautes au cours d'une mission de longue durée en dehors de la magnétosphère risquent, quant à elles, d'être élevées et d'avoir par conséquent des conséquences délétères. Cependant, du fait de la difficulté à simuler les radiations spatiales, peu d'études ont été réalisées sur le SI. De plus, contrairement à la microgravité (qu'il est possible d'obtenir à bord de l'ISS), les chercheurs sont dans l'impossibilité de valider les résultats des études menées sur les radiations spatiales. En effet, aucune étude sur l'Homme hors de la magnétosphère n'a pu être conduite à ce jour, ce qui limite considérablement les connaissances vis-à-vis des effets des radiations spatiales sur les astronautes. Ainsi, les données présentées dans cette partie doivent par conséquent être prises en compte avec précaution puisqu'elles portent sur les effets de radiations spatiales simulées.



L'exposition de moelle osseuse à des radiations spatiales simulées (éruption solaire et rayonnement cosmique) a montré une altération de l'hématopoïèse ainsi qu'une augmentation des dommages de l'ADN et du développement de cancers de type leucémique [295]. De plus, l'exposition de cellules souches hématopoïétiques à différents niveaux de radiation a également montré une altération de la différenciation des cellules appartenant à la lignée myéloïde [593]. Des études ont également montré que des radiations spatiales simulées entraînaient une activation des cellules de la microglie (macrophages présents dans le SNC) liée à un déficit des processus cognitifs [594,595]. Bien que le type de radiation utilisé ne soit pas directement lié à l'espace, une étude a également montré une diminution de l'efficacité de monocytes exposés à des radiations micro-ondes [596], suggérant ainsi que ce type de cellule immunitaire pourrait être susceptible d'être affecté par des radiations spatiales.

De plus, les radiations peuvent engendrer des mutations ainsi que la production de ROS. L'ensemble de ces altérations pourraient entraîner une apoptose précoce et/ou une perte de fonction des cellules du SI en cours de différenciation ou matures. Elles sont également susceptibles d'engendrer des mutations menant à une transformation tumorale comme cela a été montré dans les études citées ci-dessus. De manière intéressante, ces mutations peuvent également toucher certaines bactéries (e.g. *Acinetobacter*, *Saccharomyces cerevisiae*) qui sont capables de survivre après irradiation ou en présence de ROS [597,598]. D'autres bactéries sont également capables de mettre en place des systèmes de réparation de l'ADN [599] et de détoxification des ROS [600] leur permettant ainsi de survivre aux radiations ionisantes (e.g. *Deinococcus*) [601,602]. De plus, les bactéries peuvent résister efficacement aux radiations sous forme de spores puisque ces spores ne contiennent que très peu d'eau ce qui réduit la possibilité de production de radicaux hydroxyles [603–605]. Ainsi, les effets causés par les radiations sur les bactéries sont susceptibles d'entraîner une augmentation des risques d'infection pour les astronautes qui présentent, de surcroît, une diminution de l'efficacité de leur SI. Les radiations spatiales constituent par conséquent un stress majeur et un risque important pour la santé des astronautes.

### *b) Les stress socio-environnementaux*

De nombreux stress socio-environnementaux sont rencontrés par les astronautes au cours de leurs missions (e.g. perturbation du rythme circadien, isolement et confinement



extrême). Il faut savoir que l'isolement et le confinement ont un impact sur le SI [319,588,606–609] et que des effets plus marqués ont été observés lorsque le confinement était réalisé dans un espace plus réduit. De plus, un espace confiné augmente la probabilité et la vitesse de transmission des agents infectieux ce qui constitue un danger, en particulier lorsque le SI est affaibli. Dans le cas des missions en Antarctique (modèle de simulation d'isolement extrême) une altération de la fonction des LT (diminution de leur prolifération et de leur réponse à l'Ag) ainsi qu'une réactivation de certains virus ont été observés [610–612]. De manière intéressante, cette réactivation de virus latents a également été observée en période de stress intense (e.g. examens [613]) et au cours des missions spatiales (**cf. Parties III.B.b. ; III.C.1. et III.C.2.**).

Des dérégulations immunitaires telles qu'une augmentation du nombre de leucocytes, granulocytes et monocytes circulants ont également été observées durant des missions menées dans les laboratoires situés sur le plancher océanique (NEEMO ; confinement et isolement extrême) [614]. Le SI semble donc être en état « d'alerte » durant ces missions de simulation de l'environnement spatial [615] ce qui se rapproche des effets du stress aigu sur le SI (**cf. Partie III.B.1.a.**).

Il faut toutefois rester prudent quant à l'extrapolation des résultats de ces études puisque la pression élevée (NEEMO) et l'absence de confinement (Antarctique) ne sont pas retrouvées en vol. Les stress socio-environnementaux sont donc susceptibles d'impacter le SI et il faut également garder à l'esprit qu'ils impactent de manière significative l'état émotionnel des individus. Des contremesures permettant de limiter leurs effets devront par conséquent être développées afin de garantir la santé des astronautes au cours de missions de longue durée.

### *c) Les changements de gravité*

#### **i. L'hypergravité**

L'hypergravité est un terme décrivant une situation durant laquelle un individu se trouve dans un environnement où la valeur du vecteur gravitaire est supérieure à 1g (gravité Terrestre). En effet, au cours des missions spatiales, les astronautes sont sujets à des phases d'hypergravité aiguë et ce notamment au moment du décollage et de l'atterrissage. Il a été montré que les modifications du système immunitaire observées en vol semblent indépendantes de ces périodes d'hypergravité puisqu'elles persistent tout au long des missions de longues durées [582]. Néanmoins, l'hypergravité est un stress susceptible





d'altérer le bon fonctionnement du SI. Il est à noter que les cellules les plus étudiées en condition de gravité altérée sont les lymphocytes. Des souris exposées à différents niveaux d'hypergravité (2g et 3g) durant 21j présentent une diminution de masse corporelle ainsi que de la rate et du thymus [616]. Une diminution des populations de monocyte/macrophages, de lymphocytes et de granulocytes circulants, corrélée à l'augmentation du niveau de gravité, a également été observée dans cette étude. Ces résultats montrent par conséquent que l'hypergravité altère à la fois le nombre et la distribution des leucocytes murins particulièrement durant la première semaine de centrifugation. Des résultats similaires avaient été observés dans une étude utilisant une valeur d'hypergravité moindre (1,6g durant 7 et 40j) [617]. En effet, ces auteurs ont montré une diminution du nombre total de leucocytes et plus particulièrement des lymphocytes présents dans la rate, le thymus et circulants [617].

Toutefois, le niveau d'hypergravité ainsi que la durée d'exposition peuvent entraîner des effets différents. En effet, notre laboratoire a montré une augmentation du niveau de corticostérone uniquement chez les souris exposées à 3g mais pas à 2g mettant ainsi en évidence une réponse au stress variable selon le niveau d'hypergravité [618]. De plus, une diminution de la réponse à l'Ag des lymphocytes T spléniques de souris exposées à l'hypergravité chronique a été mise en évidence ainsi qu'une diminution de la quantité de chimiokines (MCP-1 and IP-10) et de cytokines de type Th1 (IFN $\gamma$  et IL2). Encore une fois, cette diminution est plus importante à 3g qu'à 2g. De manière intéressante, la concentration d'IgG et d'IgA sériques étaient supérieures aux contrôles uniquement pour les souris soumises à une hypergravité de 2g. Bien que les effets physiologiques puissent être modulés différemment par le niveau d'hypergravité, il semblerait néanmoins que cette dernière entraîne globalement, une diminution du nombre et de l'efficacité des cellules du SI. L'exposition à l'hypergravité pourrait ainsi diminuer la réponse allergique comme cela a été montré chez la souris [619] mais il est cependant à noter que cette étude utilise un niveau d'hypergravité chronique (1 mois) très élevé (5g). A l'inverse, une autre étude a montré qu'une phase d'hypergravité élevée (10g) et aigüe (4h) provoque une exacerbation de la réponse allergique en augmentant notamment la concentration d'IL-5 sérique et en favorisant l'infiltration de cellules du SI telles que les éosinophiles, les neutrophiles et les lymphocytes dans les tissus pulmonaires [620]. Cette information rappelle les effets du stress aigu sur le SI discutés ci-avant (**cf. Partie III.B.1.a.**). Des LT humains cultivés en



condition hypergravitaire chronique (10g durant 11j) ont notamment été montrés comme développant une motilité plus précoce par rapport à des LT ayant été préalablement cultivés en condition normogravitare [621]. Enfin, une étude réalisée chez la souris par notre laboratoire a montré une altération de 85% du répertoire du TCR $\beta$  de nouveau-nés développés en condition hypergravitaire [569]. Cette étude montre par conséquent que la gestation en condition de gravité altérée pourrait modifier la reconnaissance de l'Ag et par conséquent la réponse immunitaire.

Outre les LT, l'influence des changements gravitaires sur les macrophages, et plus particulièrement sur l'explosion respiratoire (« oxidative burst » en anglais), a également été étudiée [622]. Cette étape d'explosion respiratoire aboutit à la formation de radicaux oxygénés dont la toxicité provoque la mort des bactéries contenues dans la vacuole de phagocytose. Ils ont montré que la production de ROS était rapidement altérée par des changements gravitaires (quelques secondes) et que les altérations étaient dépendantes du niveau de gravité [622]. En effet, la microgravité simulée par clinostat 2D induit une diminution de la production de ROS alors que, à l'inverse, l'hypergravité provoque une augmentation de leur production. Ainsi, les changements gravitaires impactent le SI mais les durées de stress et les niveaux de gravité entraînent des effets différents.

## ii. La microgravité

### ➤ *Effets de la microgravité sur les bactéries*

Les bactéries se divisent plus rapidement que ce soit en microgravité réelle ou simulée [623–626]. De plus, une augmentation de la virulence [627,628] et de la résistance aux antibiotiques [629–632] de certaines bactéries ont été observées en vol ainsi qu'une altération de la composition des flores bactériennes intestinale [633], orale [634,635] et nasale [634]. Ces perturbations des flores bactériennes commensales peuvent engendrer une dysbiose et le développement de bactéries pathogènes opportunistes telles qu'*Escherichia coli*, *Enterobacteria* et *Clostridia* [636,637]. De plus, la capacité de certaines bactéries (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*) à former des biofilms a été montrée comme étant altérée en vol [627,638] et en microgravité simulée [639–644]. Le développement de biofilms a notamment été observé dans les circuits d'eau mais également sur d'autres surfaces [645–647]. Cette tendance générale à augmenter la capacité des bactéries à former des biofilms en vol peut poser des problèmes pour la santé



des astronautes puisque les infections sont basées sur cette formation de biofilms et que les bactéries présentes dans ceux-ci sont plus difficiles à reconnaître par le SI et à traiter [648,649]. L'ensemble des modifications subies par les bactéries en condition microgravitaire (mais également en présence de radiations ; **cf. partie III.C.2.a.**) sont à mettre en regard des modifications observées au niveau du SI.

### ➤ *Effets de la microgravité sur le SI*

#### ✓ *Généralités*

En règle générale, le SI est moins efficace en vol et ces altérations semblent être dues au grand nombre de stress subis par les astronautes, sans qu'il soit toutefois possible d'identifier l'impact de chaque stress de manière individuelle. Au cours de ce projet, celui qui nous intéresse plus particulièrement est l'impact de la microgravité sur le SI. En effet, le SI s'est développé en présence de la gravité et son absence est donc susceptible d'induire un stress et de perturber son fonctionnement.

Une expérience menée en milieu clos sur Terre a montré une diminution de la RI médiée par les lymphocytes mais pas d'augmentation au niveau des infections virales ou de la réactivation de virus latents [319]. Ces deux derniers paramètres ayant été observés en vol, leur absence en réponse à un stress de type isolement suggère que la microgravité pourrait être un facteur jouant un rôle important. En effet, de nombreuses infections ont été rapportées en vol [650] et des altérations du SI ont été observées à la fois en condition de microgravité réelle et simulée [651].

Concernant le SI, il a été montré que les neutrophiles étaient affectés par les vols spatiaux [652–654], tout comme les monocytes qui présentent une dépolymérisation du cytosquelette d'actine [655] ainsi qu'une altération de leur activation au LPS en condition microgravitaire [656]. Une diminution du nombre de lymphocytes [652] et d'autres cellules du SI a également été rapportée en microgravité. En effet, concernant les lymphocytes, il a été montré que la microgravité présente un effet pro-apoptotique [657] et diminue leur prolifération [658,659]. Concernant les LB, une étude menée au laboratoire et portant sur les effets de la suspension anti-orthostatique sur la lymphopoïèse B montre que cette dernière est diminuée du fait d'un blocage entre le stade pro-B et le stade pré-B [570]. De manière intéressante, ces modifications semblent similaires à celles observées au cours du vieillissement. L'activation des LT en condition microgravitaire est également très affectée [660–664]. Cette diminution de l'activation des LT [665] serait due à une diminution de la



production d'IL-2 et de l'expression de son récepteur [666–669]. De plus, l'inhibition de l'activation des LT en microgravité semble également provenir de l'impact de cette dernière sur les facteurs de transduction et les voies de signalisation. En effet, en absence de gravité, de nombreux facteurs de transcriptions tels que NF- $\kappa$ B, CREB, ELK, AP-1 et STAT sont négativement régulés dans les LT [670]. Il faut savoir que ces facteurs de transcription sont responsables de l'activation des LT après stimulation du TCR et qu'ils sont sous l'influence de PKA (Protéine kinase A). Ainsi, PKA pourrait jouer un rôle majeur quant aux effets de la microgravité sur les LT puisque sa signalisation (responsable de la régulation de l'activation des LT) est inhibée par la microgravité [670]. La microgravité a par conséquent un fort impact qui a été beaucoup étudié sur les LT contrairement aux cellules dendritiques qui sont pourtant leurs partenaires privilégiés. Etant donné leur rôle majeur dans l'orchestration de la RI, il nous a paru important d'étudier les effets de la microgravité sur les DC.

✓ *Effets de la microgravité sur les DC*

Il a été montré que la microgravité diminue significativement la différenciation des DC à partir de monocytes d'astronautes prélevés en fin de mission [671] ou de cellules souches hématopoïétiques humaines exposées à la microgravité simulée [672]. De plus, la fonction phagocytaire, le phénotype et la production d'IL-12 (utile pour la polarisation des LTCD4+ naïfs vers un profil Th1) de DC humaines sont affectés par la microgravité simulée [673]. Il est cependant à noter que seuls les marqueurs phénotypiques HLA-DR (= CMHII) et CD80 ont été pris en compte dans ces expériences relativement anciennes. Néanmoins, ces résultats suggèrent une altération de l'efficacité de réponse aux pathogènes, ce qui a été montré *in vitro*, avec une diminution de l'activité des LTc cultivés en microgravité et en présence de différents types d'Ag [674]. Ces résultats sont à mettre en relation avec le fait que les lymphocytes expriment moins de LFA-1 en condition microgravitaire [675] suggérant ainsi que la fonction des DC pourrait être altérée. En effet, LFA-1 est une intégrine indispensable au contact entre DC et LT afin de former la synapse immunologique lors de la présentation de l'Ag (**cf. partie I.C.2.f.i.**). De manière intéressante, une étude *in vivo* dans laquelle des cellules OT-II (lymphocytes T présentant un TCR transgénique et reconnaissant spécifiquement l'ovalbumine de poulet) transférées à des souris stimulées avec de l'ovalbumine en vol, a montré une diminution de la tolérance durant un vol spatial par rapport aux souris stimulées à l'ovalbumine sur Terre [676]. Cette expérience a également révélé une augmentation des cytokines pro-inflammatoires produites par les splénocytes





murins [676]. Ces résultats semblent en contradiction avec la probable diminution de réponse aux pathogènes évoquée dans l'étude des effets de la microgravité simulée sur des DC humaines présentée ci-dessus [673]. Cependant, ces effets contradictoires pourraient s'expliquer par les différences de modèles utilisés dans ces études: Homme vs souris ; *in vitro* vs *in vivo* ; espace vs Terre. Enfin, deux études montrent une diminution de la viabilité des DC exposées à la microgravité simulée [674,677] qui aurait par conséquent un effet pro-apoptotique.

Ainsi, les vols spatiaux diminuent l'efficacité du SI et cette diminution semble être la conséquence des principaux stress rencontrés en vol que sont les radiations, les stress socio-environnementaux et la microgravité. L'affaiblissement du SI est à mettre en regard des modifications subies par les bactéries en vol et nous avons vu que la microgravité, le confinement et les radiations étaient susceptibles d'augmenter leur pouvoir infectieux. De plus, nous avons pu voir que les LT et les DC étaient négativement impactés par la microgravité. Ces dernières étant responsables de l'orchestration de la RI, il nous a par conséquent semblé essentiel d'étudier les effets de la microgravité simulée sur le phénotype et la fonction des DC.



## Objectifs du projet

---

Au cours des vols spatiaux, les organismes sont confrontés à de nombreux stress tels que la microgravité, les radiations, l'isolement et le confinement. Cet environnement particulier est connu pour engendrer des altérations physiologiques, cellulaires et moléculaires notamment au niveau du système immunitaire [585]. De manière intéressante, certaines de ces altérations, mises en évidence lors de vols spatiaux ou grâce à l'utilisation de modèles terrestres, ressemblent à celles observées lors du vieillissement. De plus, avec les avancées technologiques, les vols spatiaux pourraient concerner une proportion plus large de la population (vol suborbitaux) et durer plus longtemps (exploration de Mars). Cependant, les différentes expériences menées jusqu'ici durant les missions spatiales ont été réalisées sur des personnes entraînées à survivre dans cet environnement hostile. Ainsi, l'étude des impacts que peuvent avoir les conditions de vol spatial, réelles ou simulées, sur l'organisme revêt un intérêt important.

Dans ce contexte, mon projet de thèse vise à étudier les effets des stress rencontrés lors de vols spatiaux sur le système immunitaire et comporte deux objectifs principaux.

### **Objectif 1 : Etude des effets de différents types de stress, rencontrés en vol et simulés en laboratoire, sur la production de la molécule C3 du complément.**

Le système du complément joue un rôle central dans le déroulement de la réponse immunitaire et donc dans la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. En effet, il va non seulement favoriser leur destruction mais également jouer un rôle très important de chimiotactisme et d'activation des cellules du SI (e.g. macrophages, granulocytes, lymphocytes) sur le site de l'infection. Ainsi, nous avons souhaité savoir si les conditions rencontrées lors de vols spatiaux pouvaient engendrer une altération du système du complément. Pour cela, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à C3 car cette molécule centrale est commune à l'ensemble des voies d'activation du complément.

Cette étude a été réalisée sur 2 modèles animaux : des amphibiens (*P. waltl*) et des mammifères (souris). Le premier étant un modèle utilisé pour l'étude du SI en condition réelle de vol spatial car ne nécessitant que peu d'entretien et étant caractérisé par une conservation des grandes caractéristiques de la réponse immunitaire par rapport à l'Homme [678]. Le second modèle à avoir été choisi est la souris puisque la majeure partie de la



recherche scientifique se fait actuellement sur modèle murin avant transposition à l'Homme. De plus, il a été montré que le système du complément est évolutivement conservé au niveau de ces espèces et ressemble à celui de l'Homme [93].

Dans un premier temps, des larves d'amphibiens ont été exposées individuellement à différents types de stress rencontrés en vol et que nous avons recréés en laboratoire : la microgravité, les radiations, le confinement, les vibrations et l'obscurité. L'impact de cette exposition sur la production de C3 a été étudié au niveau transcriptionnel. Ensuite, nous avons souhaité étudier l'impact de ces stress combinés à la fois au niveau transcriptionnel et protéique.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la production de C3 chez la souris. Pour cela, nous les avons exposées à deux modèles différents que sont le HU (HindLimb Unloading) et le CUMS (Chronic Unpredictable Mild Stress). Le premier correspond au modèle de référence utilisé pour simuler la microgravité chez le rongeur et le second est un modèle d'étude d'une combinaison de stress socio-environnementaux. La production de C3 dans le foie de ces souris a ensuite été étudiée au niveau transcriptionnel et protéique.

## **Objectif 2 : Etude des effets du stress sur les cellules dendritiques murines.**

Le deuxième objectif de mon projet visait à étudier l'effet du stress sur les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques (DC) sont des CPA (cellules présentatrices de l'antigène) professionnelles qui sont essentielles à l'orchestration de la réponse immunitaire grâce à leur capacité à sécréter des cytokines et à diriger la réponse des LT CD4<sup>+</sup> naïfs vers un profil pro- ou anti-inflammatoire. De plus, la découverte de nouveaux marqueurs ainsi que de sous-populations de DC (e.g. cellules dendritiques plasmacytoides pDC) impliquées dans de nombreuses maladies, elles-mêmes influencées par le stress, ouvrent un nouveau champ d'investigation quant à leur rôle et leur régulation suite à un stress.

Tout d'abord, nous avons étudié le phénotype de cellules dendritiques spléniques cultivées en présence de sérums issus de souris soumises à un stress de type hypergravitaire ou de type socio-environnemental. Nous avons ensuite souhaité étudier l'effet direct que pouvait avoir un stress de type gravitaire sur le phénotype et la fonction des cellules dendritiques. Pour cela, nous avons cultivé des cellules dendritiques spléniques ou des cellules dendritiques différenciées à partir de moelle osseuse en condition de microgravité simulée par RPM (Random Positioning Machine) en présence ou en absence de LPS permettant leur activation/maturation. Cette étude de l'effet direct d'un stress microgravitaire sur les



cellules dendritiques nous a ainsi permis de nous affranchir de l'environnement hormonal et cytokinique qui complexifie l'analyse des données obtenues lors d'une approche *in vivo*. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à des paramètres cellulaires, connus pour être perturbés en condition microgravitaire, comme le cytosquelette et la mort cellulaire. Ensuite, nous avons étudié les variations d'expression membranaire et de transcrits des molécules phénotypiques d'activation/maturation, essentielles aux fonctions des cellules dendritiques, comme le CMHII et les molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86. Enfin, nous avons tenté de savoir si le stress microgravitaire était capable d'influencer la fonction de présentation antigénique des cellules dendritiques.





# Matériel et Méthodes

---

## I. Animaux

Les souris utilisées afin de purifier les cellules dendritiques spléniques ou de récupérer la moelle osseuse permettant de réaliser la différenciation de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse étaient des C57Bl/6J âgées de 7 à 14 semaines (Charles River, France). Celles utilisées pour réaliser la purification des LT CD4<sup>+</sup> OT-II étaient des C57Bl/6J OT-II âgées de 4 à 8 semaines (C57Bl/6-Tg(TcraTcrb)425Cbn/Crl ; Charles River, France). L'ensemble des souris utilisées était hébergé à des paramètres de température (22 °C +/- 2°C), d'hygrométrie (50% +/- 10%) et de cycle jour/nuit (12h/12h) contrôlés avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. L'hébergement a été réalisé soit dans une animalerie (ENSAIA, Nancy, France), soit dans des armoires ventilées (A-box, Noiroto, France) (Faculté de Médecine, Nancy, France). L'ensemble des expérimentations a été réalisé selon les directives de l'Union Européenne (2010/63/UE) et la législation en vigueur au sein de l'Université de Lorraine (n° d'agrément : CELMEA-2012-008 (Faculté de Médecine) et A54-547-24 (ENSAIA)).

## II. Mise à mort

Les souris ont tout d'abord été anesthésiées à l'aide d'une station d'anesthésie Minerve® (Esternay, France) ou TemSega (Pessac, France) en utilisant un mélange équimolaire d'isoflurane (AbbVie ou Zoetis, France) et d'oxygène afin de réduire les effets du stress au moment de la mise à mort réalisée ensuite par dislocation des vertèbres cervicales.

## III. Culture cellulaire

Le milieu de culture était composé de RPMI 1640 enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma-Aldrich, L'Isles d'Abeau Chesnes, France) décomplémenté 1h à 56°C, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 10 mM d'HEPES, 2 mM de L-glutamine, 1 mM de sodium pyruvate, 1% d'acides aminés non essentiels et 57,2 µM de β-mercaptoéthanol provenant tous de chez Sigma-Aldrich (France). L'ajout de lipopolysaccharide (LPS) a été réalisé pour une concentration finale de 100 ng/mL. Les cellules ont été cultivées en incubateur à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

### A. Différenciation des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (BMDC)

Les moelles de souris C57Bl/6J ont été différenciées en BMDC à l'aide d'un traitement au FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L ou FL) provenant soit de Peprotech (France) ou de



Miltenyi Biotec GmbH (Allemagne) durant 7 jours. Les moelles des fémurs et tibias de souris ont été récupérées et une suspension cellulaire a été obtenue par pipetage vigoureux. Les cellules ont ensuite été ensemencées en flasque T75 à une concentration finale de  $2 \times 10^6$  cellules/mL en présence de FL à une concentration finale de 100 ng/mL. La moitié du volume total de culture a ensuite été renouvelé à j2 et j5 avec du milieu complet à 37°C et supplémenté en FL. Après 7 jours de différenciation, les BMDC ont été lavées et cultivées à  $2 \times 10^6$  BMDC/mL avec ou sans LPS (100 ng/mL). L'efficacité de différenciation a été évaluée par cytométrie en flux en marquant les BMDC à l'aide d'anticorps couplés à des molécules fluorescentes et dirigés contre CD11c (PC7), mPDCA (eFluo610) et CMHII (e450). Le pourcentage de BMDC CD11c positives était compris entre 75% et 85% à 7 jours de différenciation.

## **B. Purification cellulaire**

### **1) Purification des cellules dendritiques (DC) spléniques**

Chaque rate de souris a été prélevée par dissection, coupée en morceaux et incubée 15 min à 37°C 5% de CO<sub>2</sub> dans une solution provenant d'un kit de dissociation enzymatique (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) contenant un Buffer S 1X et un mélange de 2 enzymes A et D. Ensuite, les morceaux de rates ont été dissociés mécaniquement à l'aide d'un tamis cellulaire de 70 ou 40 µm EASYstrainer (Greiner bio-one, Dutscher, France). Les DC spléniques ont ensuite été purifiées à l'aide d'un kit de sélection positive en utilisant des microbilles magnétiques CD11c, du Fc Block et des colonnes LS en suivant les instructions du fabricant (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne). Brièvement, les splénocytes ont été incubés dans 100 µL de microbilles magnétiques CD11c, 40 µL de Fc block et 860 µL de tampon de tri (PBS BSA 0,5% EDTA 2mM) par rate durant 10 min à 4°C et à l'obscurité. Suite à un lavage, le culot a été repris dans 500 µL de tampon de tri/rate et la suspension cellulaire a subi une série de 2 passages en colonne dans un champ magnétique entrecoupés de 3 lavages avec 3 mL de tampon de tri. A l'issue du second passage en colonne, les DC spléniques ont été éluées dans 5 mL de tampon de tri, centrifugées et le culot cellulaire a été resuspendu dans du milieu complet. Les DC spléniques ont ensuite été ensemencées en plaque 96 puits à une concentration finale de  $1 \times 10^6$  DC/mL avec ou sans LPS (100 ng/mL). L'efficacité de purification a été vérifiée par cytométrie en flux. Les DC spléniques ont été marquées à l'aide d'anticorps couplés à des marqueurs fluorescents et dirigés contre CD4 (PE), CD11c (PC7) et CD3 (APC). L'efficacité de purification était comprise entre 85 et 95%.



## 2) Purification des LT CD4<sup>+</sup> OT-II naïfs

Les LT CD4<sup>+</sup> OT-II naïfs ont été purifiés à partir de la rate et des ganglions de souris C57Bl/6J OT-II, âgées de 4 à 8 semaines, par tri magnétique à sélection négative à l'aide du kit Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne). La rate et les ganglions d'une souris ont été récupérés et dissociés mécaniquement. Les volumes ci-après sont indiqués pour 10<sup>8</sup> cellules. Après centrifugation, le culot a été repris dans du tampon de tri (PBS BSA 0,5% EDTA 2mM) et 100 µL d'un cocktail d'anticorps couplés à la biotine ont été ajoutés et incubés à 4°C durant 5 min après homogénéisation. Ensuite, 200 µL de Tp de tri ont été ajoutés ainsi que 200 µL de microbilles anti-biotine et 100 µL de microbilles CD44<sup>+</sup>. Après homogénéisation du mélange, une incubation de 10 min à 4°C a été réalisée suivie d'un lavage à l'aide de 2 mL de Tp de tri et d'une centrifugation à 300g durant 5 min à 7°C. Le culot a ensuite été repris dans 500 µL de Tp de tri et la suspension cellulaire a été déposée dans une colonne LS placée dans un champ magnétique. La suspension cellulaire purifiée en LT CD4<sup>+</sup> naïfs correspondant à la fraction négative ainsi qu'au premier lavage a été récupérée et reprise après centrifugation dans du milieu complet en vue des expériences de présentation antigénique.

## IV. Exposition aux différents modèles de stress

### A. Exposition à la microgravité simulée

Des DC spléniques ou des BMDC ont été cultivées en suspension dans des plaques 96 puits (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) et en condition de microgravité simulée en utilisant une Random Positioning Machine (RPM) (Dutch Space, Pays-Bas) (**Figure 15C**). Les puits ont été remplis au maximum afin d'éviter la formation de bulles qui pourraient provoquer un stress de cisaillement et empêcher la simulation de la microgravité. Les plaques de culture ont ensuite été recouvertes d'une membrane Breathe-EASIER™ (Diversified Biotech, Massachusetts) permettant les échanges gazeux et placées au centre du cadre intérieur de la RPM. La rotation aléatoire et indépendante de ce cadre, couplée à celle du second cadre, permet de rediriger le vecteur gravitaire dans des intervalles de temps et des directions aléatoires simulant ainsi la microgravité (10<sup>-2</sup> g à 10<sup>-3</sup> g). La vitesse angulaire moyenne a été réglée à 60°/sec. Les cellules contrôles ont été cultivées dans les mêmes conditions mais la plaque de culture a été placée sur la base de la RPM et donc à 1g. Les expériences de RPM ont été conduites durant 6h ou 24h dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.



## B. Exposition à des sérums de souris ayant subi différents types de stress

Le sérum de souris ayant subi ou non (CT) un stress de type socio-environnemental (CUMS) ou hypergravitaire (aigu ou chronique) a été récupéré. Les différents protocoles de stress (CUMS, Hypergravitaire) sont décrits ci-après. A noter que les protocoles de stress CUMS (**décrit en partie H.1.**) et hypergravitaire chronique (**décrit en partie H.2.a.**) ont été réalisés à Paris et Saint-Etienne respectivement et que les sérums nous ont été envoyés par nos collaborateurs. Le stress hypergravitaire aigu a quant à lui été réalisé par nos soins au laboratoire. L'ensemble des sérums a été stocké à -80°C en attendant de procéder aux expérimentations.

Les DC spléniques purifiées ont étéensemencées dans une plaque 96 puits à  $10^6$  DC/mL de milieu complet en présence de sérum de souris stressée ou non dilué au 1/4 durant 24h. La plaque a ensuite été centrifugée à 400g pendant 2 minutes à 7°C et une série de deux lavages des cellules a été réalisé (150  $\mu$ L de Tp de tri) avant marquage et phénotypage par cytométrie en flux.

### 1) Modèle de stress socio-environnemental CUMS

Des souris C57Bl6N âgées de 8 à 10 semaines ont été exposées à 6 différents types de stress socio-environnementaux légers : inclinaison de la cage à 30° durant 1, 2 ou 15h ; confinement (cages 11 x 8 x 8 cm) durant 1 ou 2h ; cohabitation forcée durant 2h ; accès difficile à la nourriture durant une période nocturne de 15h sans diminution de ration alimentaire quotidienne ; perturbation du rythme circadien (15h d'éclairage permanent durant une période normalement nocturne) et 15h d'hébergement en cage souillée (50mL d'H<sub>2</sub>O dans 1kg de litière) (**Tableau 2**). Ces différents stress ont été appliqués en accord avec Pardon et al. [679] et Gagnier et al. [342]. Les périodes de stress ont duré 1h en matinée, 2h l'après midi et 15h la nuit (18h – 9h) et étaient toujours séparées par des intervalles de temps de 2h sans exposition au stress afin d'éviter tout phénomène d'habituation. Les animaux (n = 3) ont également été placés en cycle jour/nuit inversé entre le vendredi soir et le lundi matin. Cette procédure de stress était implémentée sur une semaine et répétée durant 3 semaines. Le groupe contrôle (n = 3) était hébergé en condition normale (2 souris/cage (37,5 x 21,5 x 18 cm) dans une autre pièce de l'animalerie. Le protocole de stress a été réalisé au Centre de Recherche en Psychiatrie et Neurosciences (INSERM UMR 894) de





la Pitié Salpêtrière à Paris. Ces procédures ont été validées par le Ministère de la Recherche (#00966.02).

## **2) Stress hypergravitaire**

### ***a) Modèle de stress hypergravitaire chronique***

Des souris C57Bl6J âgées de 8 à 10 semaines ont été hébergées par 2 dans des cages standards qui ont été placées sur les nacelles d'une centrifugeuse à large rayon [618] dotée d'équipements anti-vibration et conçue pour être la plus silencieuse possible. La centrifugeuse a été réglée sur une vitesse de rotation de 29,6 rpm produisant une accélération de 2G au centre des nacelles. La centrifugation (n = 12) a duré 3 semaines sans interruption grâce à un stock de nourriture et d'eau suffisant et à une surveillance continue à distance des souris par vidéo infrarouge. Les souris contrôles (n = 12) ont été hébergées dans les mêmes conditions environnementales (mêmes cage, nacelle et pièce) excepté le fait qu'elles ont été placées en position statique (1g). Ce protocole de stress a été réalisé au sein de l'unité INSERM U1059 à St Etienne. Ces procédures ont été validées par le Ministère de la Recherche (#04827).

### ***b) Modèle de stress hypergravitaire aigu***

Des souris C57Bl6J âgées de 7 à 12 semaines ont été placées isolées dans des boîtes recouvertes de papier afin de limiter les perturbations d'ordre spatiale (n = 3/groupe). Les boîtes contenant les souris ont ensuite été placées dans les nacelles d'une centrifugeuse réglée pour créer 2g d'accélération au niveau des nacelles durant 3h. A l'issue des 3h de centrifugation, les souris ont été immédiatement mises à mort et leur sang a été prélevé par ponction intracardiaque. Cette procédure a été validée par le comité local d'éthique de Nancy (CELMEA-2012-008).

## **V. Dosage de la corticostérone sérique (ELISA)**

Le dosage de la corticostérone sérique a été réalisé par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) selon les instructions du kit « DetectX Corticosterone Enzyme Immunoassay » (Arbor assays, Euromedex, France). Dans un premier temps, les sérums ont été dilués au 1/2 dans un tampon de dissociation fourni dans le kit afin de libérer la corticostérone circulante. Le mélange sérum/tampon a ensuite été dilué au 1/25 dans un second tampon fourni. Afin de pouvoir quantifier de manière précise la quantité de corticostérone sérique, une gamme étalon a été préparée en parallèle en suivant les instructions du fabricant. Pour cela, des dilutions en cascade ont été réalisées à partir d'une



solution de corticostérone à 100 000 pg/mL. Pour chaque point de gamme ainsi que pour chaque échantillon, 50 µL ont été déposés dans une plaque 96 puits préalablement immunoadsorbés avec des anticorps dirigés contre la partie constante des IgG de chèvre. Ensuite, 25 µL/puits de corticostérone couplée à une enzyme, la HRP (péroxydase de raifort), ont été ajoutés. Enfin, 25 µL d'IgG de chèvre anti-corticostérone ont été déposés suivi d'une incubation d'1h à température ambiante sous agitation. Une série de 3 lavages a été réalisée, 100 µL de TMB (tétraméthylbenzidine) ont été ajoutés puis la plaque a été incubée 30 min à l'obscurité. A l'issue de cette incubation, 50 µL de solution « stop » ont été ajoutés dans chaque puits et l'absorbance a été mesurée à 450 nm grâce à un lecteur de plaque (WALLAC 1420 VICTOR<sup>2</sup> microplate reader). Enfin, la concentration en corticostérone sérique de chaque échantillon a été déterminée grâce à la normalisation des valeurs d'absorbance obtenues par rapport à celles de la gamme étalon.

## **VI. Criblage des cytokines par cytokine array**

Le screening des cytokines présentent dans les surnageants des DC spléniques exposées à la RPM ou dans les sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire (aigu ou chronique) a été réalisé suivant les instructions du kit « Proteome profiler mouse cytokine array » fourni par Bio-techné®. Dans le cas des surnageants, un mélange de triplicats de puits de culture a été réalisé après 24h d'exposition des DC spléniques à la RPM. Dans le cas des sérums, un mélange de trois sérums utilisés pour l'exposition des cDC spléniques a été réalisé. Ces mélanges ont ensuite été stockés à -80°C avant utilisation. Brièvement, les membranes de nitrocellulose (sur lesquelles sont fixés les anticorps de capture à des spots bien précis et en duplicat) ont préalablement été bloquées grâce à l'utilisation d'un tampon de blocage fourni durant 1h sous agitation. Pendant ce temps, un cocktail d'anticorps de détection couplés à la biotine a été ajouté et le mélange a été homogénéisé et incubé 1h à température ambiante. Le mélange a ensuite été incubé sur les membranes de nitrocellulose (1 membrane par condition CT ou RPM ; CT ou stress hyperG) durant la nuit sous agitation à 4°C. Le lendemain, les membranes ont subi une série de lavages suivie par l'ajout d'une solution contenant de la HRP couplée à la streptavidine durant 30 min sous agitation et à température ambiante. A l'issue de ce marquage et d'une série de lavages, une solution contenant un mix de réactifs de détection par chimioluminescence a été ajoutée sur les membranes durant 1 min et le

**Tableau 3 : Conditions et couples d'oligonucléotides utilisés pour les qPCR**

Transcripts	Oligonucléotides	Séquences (5'-3')	Température d'hybridation (°C)	
MHCII	Sens	5'-TTGGCCTTTTCATCCGTCACA-3'	60°C	
	Anti-sens	5'-GTGGATACAATAGTACCATGCT-3'		
CD40	Sens	5'-GTGGTCAAGAAACCAAAGGATA-3'		
	Anti-sens	5'-TTACCATCCTCCTGTGTGACA-3'		
CD80	Sens	5'-TTTCAGACCGGGGCACATAC-3'		
	Anti-sens	5'-ATCCTTTTAGTGTCTGCAGATG-3'		
CD86	Sens	5'-GCACGGACTTGAACAACCAG-3'		
	Anti-sens	5'-GGGCACGGCAGATATGCAG-3'		
Gusb	Sens	5'-CCGATTATCCAGAGCGAGT-3'		61°C
	Anti-sens	5'-CTCAGCGGTGACTGGTTCG-3'		
Eif3f	Sens	5'-CATCAAGGCCTATGTCAGCA-3'		
	Anti-sens	5'-AGGTCAACTCCAATGCGTTC-3'		
Ef1a	Sens	5'-AGAACCAGCCCAGAACCGAA-3'		
	Anti-sens	5'-GCAGCTGAGACTCCTTCCA-3'		

signal a été acquis en utilisant un imageur Fusion FX-7 (Vuilber Lourmat, France). Le marquage a ensuite été quantifié par analyse densitométrique à l'aide du logiciel Image J®.

## VII. RT-qPCR

L'ARN total des DC spléniques purifiées ou des BMDC a été extrait à température ambiante grâce à des colonnes d'affinité issues du kit d'extraction sur colonne NucleoSpin®RNA XS (Macherey-Nagel, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, les cellules ont été lysées dans un tampon de lyse puis la solution a été homogénéisée grâce à une filtration sur colonne. Le lysat a ensuite été transféré dans une colonne dans laquelle une digestion de l'ADNg a été réalisée grâce à la rDNase fournie avec le kit. Après plusieurs lavages à l'aide de différents tampons fournis, l'ARN total a ensuite été élué dans un volume final de 10 µL d'eau ultrapure sans RNase et dosé au Nanodrop (Thermo Scientific, France).

Les ARN totaux purifiés ont ensuite été rétro-transcrits de la manière suivante : 200 ng d'ARN ont été incubés avec 1 µL de dNTPs (10 mM) et 1 µL de « random hexamers » (50 ng/µL) pour un volume final de 12 µL durant 5 min à 65°C puis 2 min à 4°C. Un mélange contenant 4 µL de tampon RT 5X ; 2 µL de DTT à 0,1M ; 0,5 µL de « RNase out » à 40U/µL (Thermo Scientific, France) et 0,5 µL d'enzyme MMLV à 200 U/µL a ensuite été ajouté. L'ensemble a été incubé 10 min à 25°C puis 50 min à 37°C et enfin 5 min à 70°C afin d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc).

Les PCR quantitatives ont ensuite été réalisées sur une machine Realplex<sup>2</sup> mastercycle (Eppendorf, France) afin d'évaluer les variations d'expression des transcrits. L'ensemble des couples d'oligonucléotides utilisés ainsi que les températures d'hybridation sont cités dans le **tableau 3**. Pour chaque ARNm analysé, 1,5 µL d'ADNc a été déposé dans un mélange contenant 7,5 µL de mix « qPCR 2X Takyon » (Eurogentec, Belgique), 1,5 µL d'amorce sens à 1 µM, 1,5 µL d'amorce anti-sens à 1 µM et 3 µL d'H<sub>2</sub>O up. Le protocole de qPCR est comme suit : 3 min à 95°C suivi par 40 cycles de 15 sec à 95°C et 1 min aux températures d'hybridation indiquées en **tableau 3**. Chaque point de qPCR a été réalisé en triplicat. Pour chaque marqueur étudié, l'efficacité d'amplification a été évaluée et la normalisation a été réalisée à l'aide d'un couple de gènes de référence (Gusb/Eif3f pour les BMDC et Gusb/Ef1a pour les DC spléniques) dont la stabilité a été vérifiée pour chaque analyse, grâce à la feuille de calcul Bestkeeper [680]. L'ensemble des couples d'oligonucléotides a été acheté chez Qiagen (Courtaboeuf, France) et ciblés sur différents exons afin de s'assurer qu'ils ne



puissent pas s'hybrider à d'éventuelles traces d'ADNg. Leur spécificité a été vérifiée en utilisant l'outil d'alignement de séquences BLAST et les séquences d'ARNm renseignées par NCBI (U.S. National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Etats Unis)).

## **VIII. Présentation antigénique et marquage de LFA-1 par immunofluorescence**

Des DC spléniques purifiées ont été colorées à l'aide d'un Cell Tracker™ Blue fluorescent (Molecular Probes® Life Technologies™) à 5 µM durant 30 min. Après lavage, elles ont été soumises à 10h de microgravité simulée (RPM) ou non (CT) au bout desquelles elles ont été mises en présence d'ovalbumine de poulet (OVA<sub>323-339</sub>; PolyPeptide GROUP; France) à 2 µg/mL (Ova) ou non (non stimulées = 0 min). La plaque RPM a ensuite été relancée durant 14h pour un total de 24h d'exposition à la microgravité simulée.

Les DC spléniques exposées ou non à la RPM et/ou à l'Ova ont été déposées durant 20 min (37°C, 90% d'hygrométrie et 5% de CO<sub>2</sub>) sur lame Polysine® (Thermo Scientific; Allemagne). Après aspiration du milieu, une suspension de LT CD4<sup>+</sup> naïfs a ensuite été déposée pour un ratio final de 3LT/DC durant 20 min ou 60 min (37°C, 90% d'hygrométrie et 5% de CO<sub>2</sub>). Les lames ont ensuite été lavées à l'aide de 200 µL de PBS BSA 0,2% et les cellules ont été fixées en utilisant du PFA 4% durant 20 min en chambre humide à température ambiante. Après une série de 3 lavages au PBS BSA 0,2%, 100 µL de solution de blocage (PBS BSA 0,2% sérum de chèvre 5%) ont été déposés durant 45 min en chambre froide. Après élimination de la solution de blocage, les anticorps primaires de rat anti-LFA-1 de souris (BD Bioscience BD Pharmingen™) dilués au 50<sup>ème</sup> ont été incubés durant 1h en chambre humide. Après une série de 3 lavages, les Ac secondaires de chèvre anti-IgG de rat couplés à un fluorochrome Alexa Fluor® 546 (Life Technologie) dilués au 200<sup>ème</sup> ont été incubés durant 1h en chambre humide à l'obscurité. Enfin, après une série de 5 lavages, les lames ont été montées et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus AX70. 4 champs/condition, choisis aléatoirement, ont été photographiés en utilisant une caméra Olympus DP70 et le logiciel DP Controller et DP Manager. Les temps d'exposition ont été déterminés grâce aux dépôts marqués dans Ac primaire (contrôle négatif). L'analyse des images a été effectuée en double aveugle sur le logiciel ImageJ. Les paramètres analysés sont les suivants : nombre de DC (cellules bleues), nombre de conjugués (DC en contact avec LT naïf) et nombre de synapses (conjugué avec relocalisation de LFA-1 au niveau de la zone de contact).





## **IX. Cytométrie en flux**

### **A. Phénotypage des DC spléniques et BMDC**

Les BMDC ou les DC spléniques purifiées ont été marquées durant 20 min à 4 °C avec des anticorps dirigés contre les marqueurs CMHII, CD40, CD80, CD86 et CD11c respectivement couplés aux fluorochromes e450, APC, FITC, PE (eBioscience, USA) et PE-Vio 770 (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) ou PC7 (eBioscience, USA). De plus, dans le cas des BMDC, les sous-populations de BMpDC et BMcDC ont été identifiées grâce à un anticorps anti-mPDCA couplé au fluorochrome e610 (eBioscience, USA). Mis à part l'anticorps anti-CD11c dilué au 1/50, les anticorps ont été utilisés à une dilution de 1/200 dans du tampon de tri (PBS BSA 0,5% EDTA 2mM) avec du Fc block au 1/20 (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne).

### **B. F-actin**

Les BMDC ou les DC spléniques ont tout d'abord été fixées dans du paraformaldéhyde 2% (Merck KGaA, Allemagne) durant 20 min à température ambiante directement à la sortie de la RPM. Après 2 lavages au PBS, les BMDC ont été directement marquées durant 20 min à 4°C à l'aide d'un anticorps anti-CD11c-PC7 (eBioscience, USA) dilué au 1/200 dans du tampon de tri (PBS ; 0,5% de BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich), 2 mM d'EDTA (Fisher Chemical, Angleterre)) et en présence de Fc block au 1/20 (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne). Dans le cas des DC spléniques par contre, cette étape a été précédée d'un marquage de 15 min à température ambiante avec un marqueur de viabilité cellulaire (Viability™ 405/502, Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) suivi d'un lavage au PBS. L'actine-F des BMDC et DC spléniques a ensuite été marquée à l'aide d'un conjugué Phalloïdine-iFluo™ 555 (AAT Bioquest®, Etats Unis) dilué au 1/100 dans un tampon de perméabilisation PBS Saponine 1% (Merck KGaA, Allemagne) durant 30 min à 4°C.

### **C. Mesure de l'apoptose**

Afin d'estimer le pourcentage de mort cellulaire, un co-marquage Annexine V (Anx V) et Aminoactinomycine D (7AAD) a été réalisé en utilisant le kit de détection d'apoptose FITC Annexine V (BD Pharmingen™, Belgium) selon les instructions du fabricant. Les cellules marquées ont ensuite été analysées par cytométrie en flux.

La population AnxV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> correspond aux cellules vivantes, celle AnxV<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup> aux cellules nécrotiques et celles AnxV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> et AnxV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> aux cellules en apoptose précoce ou tardive respectivement. Les données de cytométrie ont été collectées en utilisant un cytomètre en flux (Gallios, Beckman Coulter, France) de l'unité mixte de service (UMS) 2008



IBSLor (Ingénierie, Biologie, Santé en Lorraine) et analysées à l'aide du logiciel FlowJo® (FlowJo LLC, Etats Unis).

## **X. Analyses statistiques**

Pour toutes les études statistiques impliquant la comparaison de 2 groupes, l'homogénéité de la distribution et l'égalité de variance ont été respectivement vérifiées avec les tests de Kolmogorov-Smirnov et de Fisher. Si l'homogénéité de distribution et/ou l'égalité de variance n'étaient pas vérifiées, les comparaisons ont été réalisées par Mann-Whitney. Dans le cas contraire, c'est-à-dire lorsque la distribution s'avérait être normale et que l'égalité de variance entre les groupes était vérifiée, nous avons réalisé un test de student.

Pour les comparaisons statistiques de 3 groupes expérimentaux ou plus, l'homogénéité de variances a été vérifiée en utilisant le test de Levene. Si l'égalité de variance était vérifiée, un test d'ANOVA suivi d'un PLSD de Fisher pour la comparaison des groupes 2 à 2 a été réalisé. Dans le cas où les variances étaient hétérogènes, nous avons effectué un Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn.

Ces différents tests ont été réalisés à l'aide du logiciel Statview® et du site internet Anastats (<http://www.anastats.fr/outils.php>). Pour chaque test, le seuil de significativité choisi était  $p < 0,05$  et une tendance pour  $0,05 < p < 0,075$ .



# Résultats

---

## I. Effets de différents types de stress, rencontrés en vol et simulés en laboratoire, sur la molécule C3 du complément.

### A. INTRODUCTION

Des dérégulations du système immunitaire ont été observées durant les vols spatiaux. Celles-ci peuvent persister tout au long d'un séjour de 6 mois en orbite [582,681]. Une étude récente a révélé que près de la moitié des astronautes ayant passé 6 mois à bord de la station spatiale internationale (ISS) ont été sujets à des désordres immunologiques [573], confirmant ainsi que ces dérégulations ne sont pas exclusivement dues aux stress liés à la phase d'atterrissage et à la réadaptation à l'environnement terrestre [572,573,582].

L'ensemble des compartiments du système immunitaire sont affectés par les vols spatiaux. Concernant l'immunité innée, il a été montré que les monocytes présentent des dérégulations au niveau de leur phénotype, de leur production de cytokines ainsi qu'une diminution de leur capacité à phagocyter *E. coli* et à dégranuler [682–684]. La production d'espèces réactives de l'oxygène par les macrophages [685] et les neutrophiles, ainsi que la capacité de phagocytose de ces derniers [653], sont également réduites. Concernant l'immunité adaptative, plusieurs études ont rapporté une réduction de l'activation des lymphocytes T en microgravité réelle ou simulée [660,662,664]. Ce phénomène résulte de changements d'expression génique, d'interactions cellulaires, de structure du cytosquelette, de transduction du signal et d'une perturbation de l'expression de protéines régulant le cycle cellulaire [584,686]. Pour ce qui est de l'immunité humorale, l'utilisation du modèle animal *Pleurodeles waltl* (Amphibien urodèle) [678] a permis de montrer que les vols spatiaux affectent la production d'anticorps en réponse à une stimulation antigénique [567,687,688]. Ceci a récemment été confirmé chez des souris exposées à un modèle, appelé suspension anti-orthostatique, permettant de simuler les effets de la microgravité [689]. L'hypergravité et la microgravité simulée altèrent également la prolifération des lymphocytes B [618,663]. Enfin, la maturation des cellules immunitaires appartenant à la lignée myéloïde [690–694] ainsi qu'aux lignées lymphoïdes B [568,570,695] et T [569,696,697] est réduite en condition microgravitaire. Il apparaît donc que les changements immunologiques induits par les vols spatiaux, durant lesquels humains et animaux font face à de nombreux types de stress (e.g. radiations, microgravité, confinement, isolement et perturbation du rythme circadien),



doivent être étudiés afin de préserver la santé des astronautes durant les futures explorations spatiales de longues durées telles que le déploiement d'une station lunaire suivi de missions ayant pour objectif l'exploration de Mars.

Dans ce contexte, les effets des conditions spatiales sur le système du complément n'ont que très peu été étudiés alors qu'il s'agit d'un élément clé de la surveillance immunitaire et de l'homéostasie. Le système du complément constitue une première ligne de défense contre les pathogènes et participe à l'orchestration des processus immunologiques et inflammatoires [698]. En effet, l'opsonisation par des molécules du complément ainsi que la signalisation pro-inflammatoire engendrée par les anaphylatoxines (résultant de l'activation du complément) permettent le recrutement des macrophages, la phagocytose et la formation du complexe d'attaque membranaire sur les cellules telles que les bactéries gram négatives. Le système du complément coordonne l'immunité innée en coopération avec les récepteurs Toll-like (TLR) [699]. Il permet de faire le lien entre la réponse immunitaire innée, l'immunité humorale et la réponse immunitaire adaptative [700].

Le système du complément est aussi connu pour son implication dans le maintien de l'homéostasie. En effet, il régule la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse afin de garantir le renouvellement des cellules immunitaires [701]. Il contribue également à la résolution de l'inflammation à travers la clairance des cellules apoptotiques et des complexes immuns [702,703]. De plus, il participe à la réparation tissulaire [704,705] et potentialise la coagulation afin de limiter les infections [706]. Le complément est également impliqué dans la synaptogénèse puisqu'il participe à l'élimination des synapses immatures au sein du système nerveux central [707], mais également à la différenciation et à la migration des cellules progénitrices neurales [708].

Enfin, il est établi que toute perturbation de la balance existant entre activation et régulation du système du complément peut induire une attaque du soi et mener à des maladies immunitaires, inflammatoires ou neurodégénératives [698].

Etant donné l'importance du système du complément et le fait qu'une étude récente a montré que l'hypergravité (un stress aigu rencontré durant les phases de décollage et d'atterrissage) augmente l'expression du composant C3 du complément, nous avons étudié les effets des stress chroniques rencontrés lors d'un vol spatial sur l'expression de cette molécule conservée au cours de l'évolution, depuis les Amphibiens jusqu'aux Mammifères [709,710].





Nous nous sommes concentrés sur la molécule C3 car c'est la protéine la plus abondante du système du complément et elle constitue le point de convergence de l'ensemble des voies d'activation du complément, que ce soit au niveau extracellulaire (voie classique, alternative ou associée aux lectines) ou intracellulaire (*via* un mécanisme dépendant des cathepsines) [711].

## B. RESULTATS ET DISCUSSION

Différents groupes de larves de *P. waltl* au même stade de développement ont été exposés à des modifications environnementales, recréées en laboratoire, similaires à celles rencontrées durant une mission à bord de l'ISS. Les expérimentations ont été réalisées sur des larves et non des adultes car elles peuvent être élevées dans de petits aquariums à bord de l'ISS (cf. **Figure 1 publication ci-jointe en annexe 1**).

### 1) Effets des stress sur la transcription de C3 chez *P. waltl*

Nous avons étudié l'influence de 5 types de stress rencontrés lors d'un séjour à bord de l'ISS sur la transcription de C3 chez des larves de *P. waltl*. Pour cela, des larves de *P. waltl* ont été exposées à la microgravité simulée par RPM (Random Positioning Machine) durant 10 jours, à une modification du rythme circadien (obscurité durant 10 jours), au confinement (espace réduit durant 7h), à des vibrations ou à des radiations (dose équivalente à un séjour de 10 jours dans l'ISS). Les transcrits de C3 ont ensuite été quantifiés par RT-qPCR. Les résultats obtenus montrent que l'exposition à la RPM (cf. **Figure 2A publication ci-jointe en annexe 1**), aux radiations (cf. **Figure 2B publication ci-jointe en annexe 1**) ou au confinement (cf. **Figure 2C publication ci-jointe en annexe 1**) provoque, respectivement, une augmentation de la quantité d'ARNm de C3 de 1,5 ; 5 et 1,7 fois par rapport aux larves contrôles. L'exposition aux vibrations provoque une diminution de moitié des ARNm de C3 (cf. **Figure 2D publication ci-jointe en annexe 1**) et 10 jours d'exposition à l'obscurité ne semblent pas affecter le niveau de transcrits de C3 (cf. **Figure 2E publication ci-jointe en annexe 1**). De nombreux stress associés aux vols spatiaux semblent donc altérer l'expression transcriptionnelle de C3.

### 2) Effets de deux combinaisons de stress sur l'expression de C3 chez *P. waltl*

Lors d'un vol spatial, les astronautes sont soumis à une combinaison de stress, et pas à un seul type de stress comme testé ci-avant. Par conséquent, nous nous sommes demandé quel



pourrait être l'effet d'une combinaison de ces stress. Malheureusement, il est techniquement impossible d'exposer des larves de *P. waltl* à l'ensemble des stress individuels. Nous nous sommes donc concentrés sur deux combinaisons de stress qui pouvaient être réalisées en laboratoire : la combinaison de l'obscurité et de la microgravité simulée par RPM (**cf. Figure 3 publication ci-jointe en annexe 1**) et la combinaison de l'obscurité et de la simulation des radiations spatiales (**cf. Figure 4 publication ci-jointe en annexe 1**).

De manière intéressante, l'obscurité combinée à la microgravité simulée n'affecte pas la transcription de C3 (**cf. Figure 3A publication ci-jointe en annexe 1**) ce qui nous amène à penser que cette combinaison annule l'effet de la microgravité simulée seule. Cependant, cette combinaison entraîne une diminution de 50% de l'expression de C3 au niveau protéique par rapport aux contrôles ou aux larves exposées à la RPM seule (**Figures 3B et 3C publication ci-jointe en annexe 1**).

D'autre part, la combinaison de l'obscurité et des radiations spatiales simulées mène à une augmentation du niveau transcriptionnel (facteur 3,5x ; **Figure 4A publication ci-jointe en annexe 1**) et protéique (facteur 1,5x ; **Figures 4B et 4C publication ci-jointe en annexe 1**) de C3. Le fait de combiner une perturbation du rythme circadien (sous forme d'exposition à l'obscurité) à des radiations ne semble donc pas statistiquement changer l'effet individuel d'une exposition aux radiations spatiales.

Ainsi, nous avons montré que l'exposition à une combinaison de stress entraîne une altération de la production de C3 que ce soit au niveau transcriptionnel et/ou protéique selon la nature des stress associés mais que cette altération ne semble pas toujours suivre les effets que peuvent avoir chaque type de stress appliqué individuellement.

### **3) Effet de stress liés aux vols spatiaux sur l'expression de C3 chez la souris**

Afin de déterminer si les résultats obtenus chez l'Amphibien pouvaient être transposés aux Mammifères et d'étudier plus en détail les effets des stress chroniques associés aux vols spatiaux, nous avons exposé des souris au modèle de suspension anti-orthostatique (appelé HU pour 'Hindlimb Unloading') simulant la microgravité [712] ou au modèle CUMS simulant les stress socio-environnementaux rencontrés durant un séjour en station spatiale [342]. Le modèle CUMS consiste à exposer des souris au confinement, à l'isolement, à des perturbations du rythme circadien et des références spatiales, à une diminution de l'apport



alimentaire et à des conditions de vie inconfortables de manière chronique, répétée et imprévisible. Ce modèle réplique certains changements immunitaires induits par les vols spatiaux [342].

Après exposition au modèle HU ou CUMS, les ARNm et les protéines C3 ont été quantifiés dans le foie des souris stressées ou contrôles car cet organe est la principale source de complément. Nos résultats montrent que ni la microgravité simulée (HU) ni les stress socio-environnementaux (CUMS) ne semblent influencer l'expression de C3 chez la souris (**cf. Figures 5 et 6 publication ci-jointe en annexe 1**) et ce, que ce soit au niveau transcriptionnel ou protéique. Cette dernière observation est en accord avec les résultats obtenus avec les larves de *P. waltl* exposées à la RPM seule qui ne montrent aucune variation protéique de C3 (**cf. Figure 3C publication ci-jointe en annexe 1**). Les modèles HU et CUMS que nous avons utilisé afin de simuler, respectivement, la microgravité ou les stress socio-environnementaux rencontrés durant un vol spatial chez la souris ne semblent donc pas influencer la production de C3.

### C. DISCUSSION

Durant les vols spatiaux, humains et animaux sont soumis à de nombreuses modifications environnementales. Dans cette étude, des larves de *P. waltl* ont été exposées à des stress chroniques similaires à ceux rencontrés durant un séjour à bord de l'ISS (microgravité, perturbation du rythme circadien, radiations, confinement et vibrations) afin de déterminer comment ces stress individuels, mais également deux combinaisons de ceux-ci, peuvent affecter l'expression d'un composant clé du système du complément.

Nous avons utilisé des larves de *P. waltl* car ce modèle remplit de nombreuses exigences techniques associées aux expérimentations spatiales, un dispositif permettant son développement à bord de l'ISS a été développé (**cf. Figure 1 publication ci-jointe en annexe 1**) et l'étude de *P. waltl* ayant séjourné à bord d'une station spatiale a permis d'améliorer notre connaissance des effets immunosuppresseurs des vols spatiaux [678]. De plus, les éléments cardinaux du système immunitaire, dont C3 [710], étant fortement conservés [713–715], les résultats obtenus sont potentiellement transposables aux Mammifères. Des études réalisées sur des souris exposées à deux modèles de stress simulant ceux rencontrés en vol ont été menées dans ce sens.



Ces travaux ont permis de montrer que l'expression protéique de C3 est affectée par une simulation des radiations spatiales ainsi que par une combinaison de deux stress chroniques (microgravité simulée et obscurité). Ces observations, couplées à l'étude ayant précédemment montré une augmentation de la quantité de protéines C3 chez des souris exposées à l'hypergravité, nous amène à penser que l'expression de C3 pourrait être modifiée en condition réelle de vol spatial. En effet, il est connu que le système du complément est sensible aux agressions ainsi qu'aux changements d'homéostasie [716]. De plus, des études précédentes ont montré que i) la radiothérapie augmente les niveaux de transcrits et de protéines C3 à la fois chez l'Homme et chez la souris [717], ii) que le modèle d'alitement volontaire (position couchée avec pieds surélevés pour simuler l'apesanteur) n'induit pas de changements de concentration sérique de C3 [718] et iii) que la privation de sommeil n'affecte pas les fluctuations circadiennes des concentrations sériques de C3 et C4 chez l'Homme [719].

Les changements de C3 observés aux niveaux transcriptionnel et protéique chez les larves de *P. waltl* pourraient avoir pour but de neutraliser les radicaux libres induits par les différents stress. En effet, il a été montré que les vols spatiaux peuvent engendrer la production de ROS chez l'Homme, le rongeur et l'Amphibien [720–723] et que le complément joue un rôle important dans les processus inflammatoires suite à un stress oxydant [724]. De plus, il est connu que les ROS sont capables d'activer le système du complément et que C3 a un rôle protecteur contre le stress oxydant [724–726]. Ces données pourraient expliquer pourquoi Baqai et collègues ont observé une augmentation des mécanismes anti-inflammatoires murins à l'atterrissage [727]. Une autre possibilité serait que les signaux de danger, tels que les protéines de choc thermique (connues pour être produites par des cellules ou des organismes stressés) dont l'expression est affectée durant les vols spatiaux [728], régulent l'expression de C3 comme cela a été montré par exemple lors du traitement photodynamique de tumeurs [729]. Cette hypothèse est supportée par la présence de sites de fixation de ces protéines de choc thermique sur le promoteur de C3 chez l'Homme, la souris et le rat [710]. Etant donné la conservation phylogénétique de C3 chez les Vertébrés, il est fort probable que le promoteur de C3 chez *P. waltl* contienne également ces sites de fixation.

Des changements d'expression de C3 pourraient être impliqués dans de nombreux désordres physiologiques associés aux vols spatiaux puisque, en plus de son implication dans





l'élimination des pathogènes, le complément participe à divers processus tels que la maturation des synapses, l'élimination des complexes immuns, l'angiogenèse, la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs, la régénération tissulaire et le métabolisme des lipides [698]. De plus, ce système est requis aux stades précoces de développement tels que les étapes de neurulation chez *P. waltl* [710] et *X. laevis* [730] mais également pour la migration correcte des cellules des crêtes neurales durant le développement précoce des Vertébrés [731].

A l'avenir, il serait intéressant de quantifier les produits d'activation du complément car de nombreux facteurs peuvent induire leur production. En effet, un lien a été établi entre certains facteurs de la coagulation et l'induction du clivage de C3 et de C5 promouvant ainsi la génération des anaphylatoxines C3a et C5a. De plus, les radiations peuvent augmenter la production de C3a et C5a [717] et les modifications membranaires présentes sur les cellules nécrotiques ou en apoptose tardive sont des activateurs potentiels du complément [698]. Par conséquent, les changements d'expression des protéines de la cascade de coagulation (notés à la fois durant et après un vol spatial [695,732,733]), les radiations spatiales et l'apoptose, fréquemment augmentée en microgravité [657,734–736], pourraient entraîner une augmentation des molécules C3a et C5a. Ces molécules ayant des propriétés pro-inflammatoires et pouvant augmenter l'expression du CMHII et des molécules de co-stimulation à la surface des cellules présentatrices de l'antigène telles que les cellules dendritiques, pourraient influencer l'activation et la polarisation des lymphocytes T vers des profils tolérogènes ou pro-inflammatoires [737,738]. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'une étude *in vivo* récente menée en condition de vol spatial a montré une altération de la tolérance [676] et une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires par les splénocytes murins. Enfin, C3a et C5a ayant une capacité chémoattractante élevée vis-à-vis des neutrophiles, des monocytes et des macrophages, une modification de leur production pourrait contribuer à expliquer les changements de distribution des leucocytes observés à l'issue de missions spatiales [584,686].

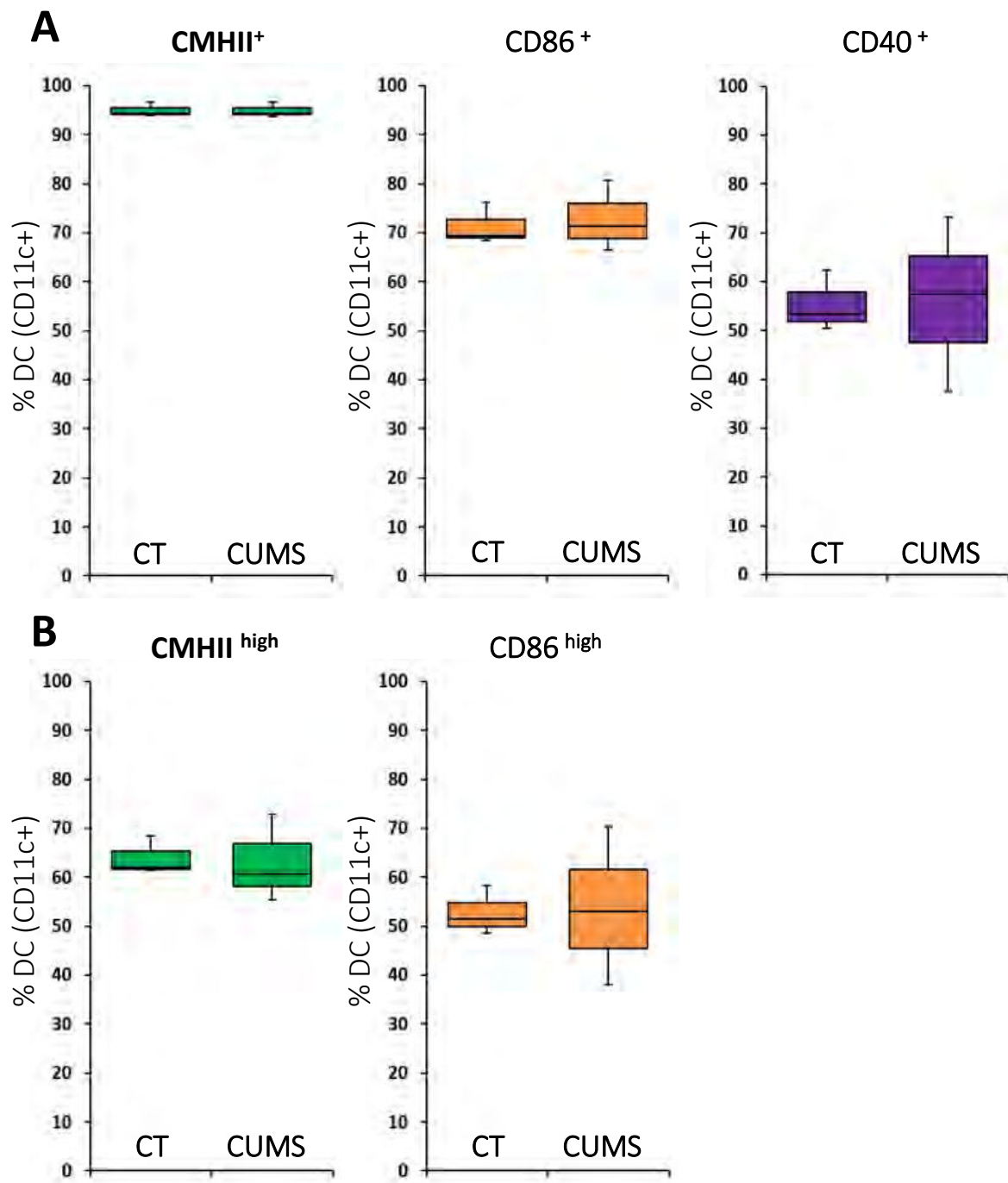
#### **D. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'analyse de larves de *P. waltl* soumises à différents types de stress associés aux vols spatiaux et recrées en laboratoire a montré que certains d'entre eux affectent l'expression de C3. Une telle augmentation pourrait potentiellement accroître le risque d'inflammation



et de dommages tissulaires associés et ainsi affecter le fonctionnement d'organes et systèmes physiologiques durant les futures missions d'exploration spatiales de longues durées. A l'avenir, il serait intéressant de mener des études sur des Mammifères en condition de vol réel afin de confirmer nos résultats, mais également afin de déterminer si les vols spatiaux affectent ou non les fonctions essentielles liées à la production d'anaphylatoxines.

Etant donné la sensibilité du système du complément vis-à-vis d'une grande variété de stimuli, les contremesures visant à éviter une potentielle activation de ce système en vol devront cibler plusieurs éléments comme, par exemple, le contrôle de l'environnement microbien et la modulation de la réponse au stress grâce, par exemple, à des  $\beta$ -bloquants comme suggéré par Crucian et collègues [739].



**Figure 17 : Le phénotype des DC spléniques exposées à des sérums de souris ayant subi un stress socio-environnemental chronique ne semble pas être altéré**

Des DC spléniques purifiées ont été cultivées en présence de sérums de souris ayant subi un stress socio-environnemental chronique (CUMS ; 21jours) ou non (CT). Après 24h, un marquage de CD11c, CMHII, CD40 et CD86 a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules CD11c<sup>+</sup> (DC) exprimant le marqueur au total (A) ou le plus fortement (high) (B). N = 1 ; n = 3 par groupe et par expérience. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

## II. Etude des effets de la microgravité simulée par RPM sur le phénotype et la fonction des cellules dendritiques

### A. Exposition des DC spléniques à des sérums de souris ayant subi un stress de type socio-environnemental ou mécanique

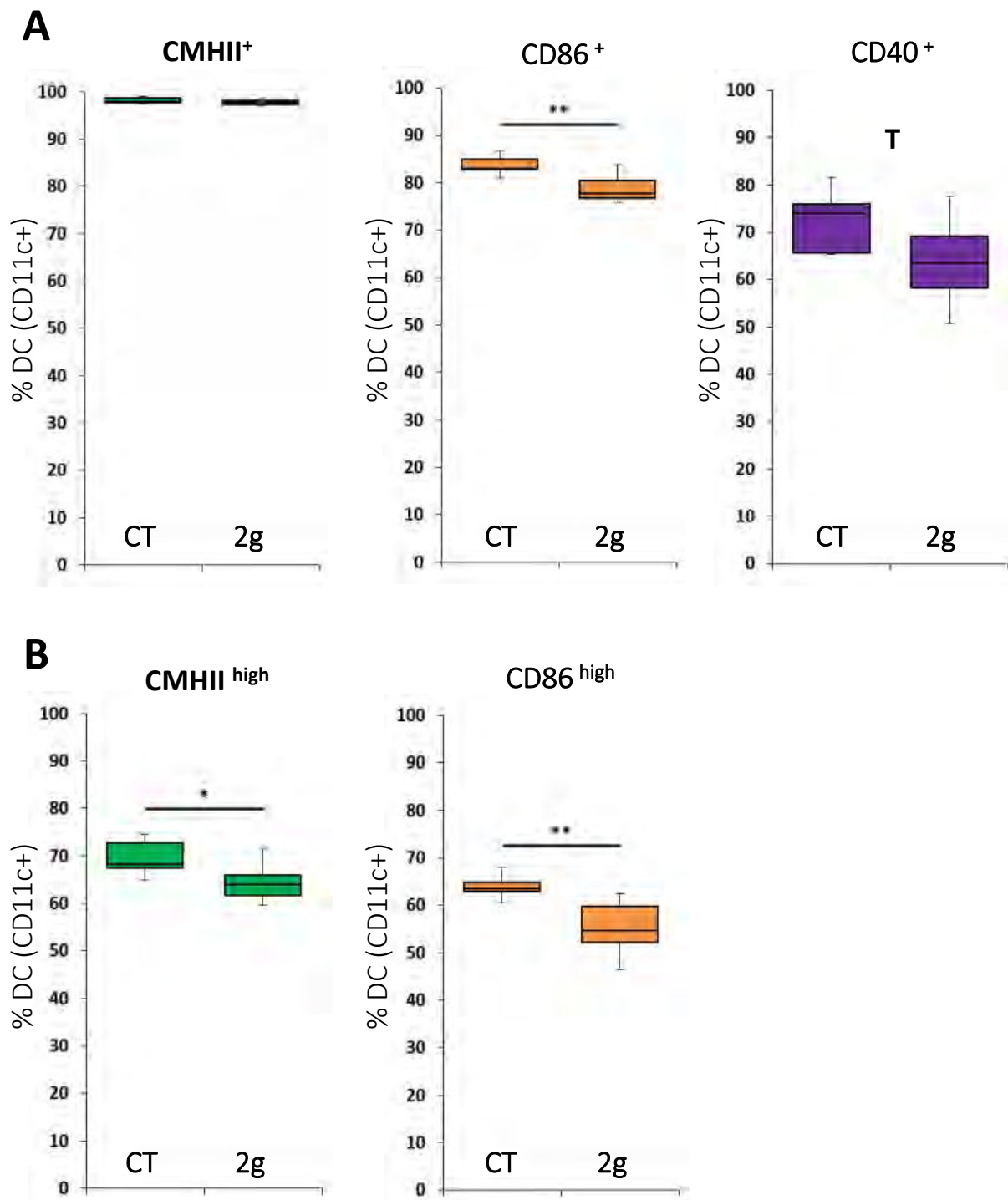
#### 1) Effets sur le phénotype d'activation/maturation des DC

Afin de tester l'effet de différents types de stress sur les DC, des DC spléniques (cDC) ont été cultivées pendant 24h en présence de sérums de souris soumises soit à un stress chronique de type socio-environnemental (CUMS ; 21 jours) ou de type hypergravitaire (2g ; 21 jours), soit à un stress aigu de type hypergravitaire (2g ; 3h).

Le phénotype d'activation/maturation de ces DC spléniques a ensuite été étudié par cytométrie en flux. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'expression membranaire des marqueurs phénotypiques CMHII, CD86 et CD40. Ces marqueurs sont essentiels à la fonction des DC puisque le CMHII va permettre la présentation de l'Ag aux LT CD4<sup>+</sup> tandis que les molécules de co-stimulation, CD86 et CD40, vont permettre leur pleine activation et leur prolifération.

Nous avons étudié le pourcentage total de DC spléniques positives pour les marqueurs CMHII, CD86 et CD40 ainsi que le pourcentage de DC spléniques exprimant très fortement les marqueurs CMHII et CD86 (noté « high »). Les résultats montrent que l'exposition de DC spléniques à des sérums de souris ayant subi un stress de type socio-environnemental (CUMS) ne semble pas affecter leur phénotype d'activation/maturation puisque ni l'expression du CMHII, ni celle des molécules de co-stimulation CD40 et CD86 ne semblent être modulées (**Figure 17**).

A l'inverse, une exposition des DC à des sérums de souris ayant subi un stress de type mécanique, hypergravitaire, entraîne une modulation de l'expression de l'ensemble des marqueurs étudiés. En effet, les résultats montrent une diminution de l'expression du CMHII, de CD40 et de CD86 soit au niveau de la population totale de DC spléniques exprimant ces marqueurs, soit au niveau de la population de DC spléniques l'exprimant fortement (CMHII et CD86 high). Ainsi l'expression de surface de l'ensemble des marqueurs étudiés est impactée par l'exposition à des sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire qu'il soit chronique ou aigu (21 jours et 3h, respectivement) (**Figure 18 et 19**). De plus, les effets du stress hypergravitaire aigu sur les DC (diminution de CD40, CMHII high et CD86 high) semblent plus importants ( $p < 0,001$ ) que ceux induits par le stress



**Figure 18 : Les DC spléniques exposées à des sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire chronique présentent un phénotype plus immature**

Des DC spléniques purifiées ont été cultivées en présence de sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire chronique (2g ; 21j) ou non (CT). Après 24h, un marquage de CD11c, CMHII, CD40 et CD86 a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules CD11c<sup>+</sup> (DC) exprimant le marqueur au total (**A**) ou le plus fortement (**B**).  $N = 2$  ;  $n = 3$  par groupe et par expérience. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

hypergravitaire chronique ( $0,05 < p < 0,075$  pour CD40;  $0,01 < p < 0,05$  pour CMHII high et  $0,001 < p < 0,01$  pour CD86 high).

L'ensemble de ces résultats montre que les DC spléniques sont sensibles à des facteurs présents dans des sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire aigu ou chronique et que ces facteurs induisent la diminution de l'expression des marqueurs d'activation/maturation des DC.

## 2) Etude des facteurs sériques présents dans les sérums de souris soumises à différents types de stress

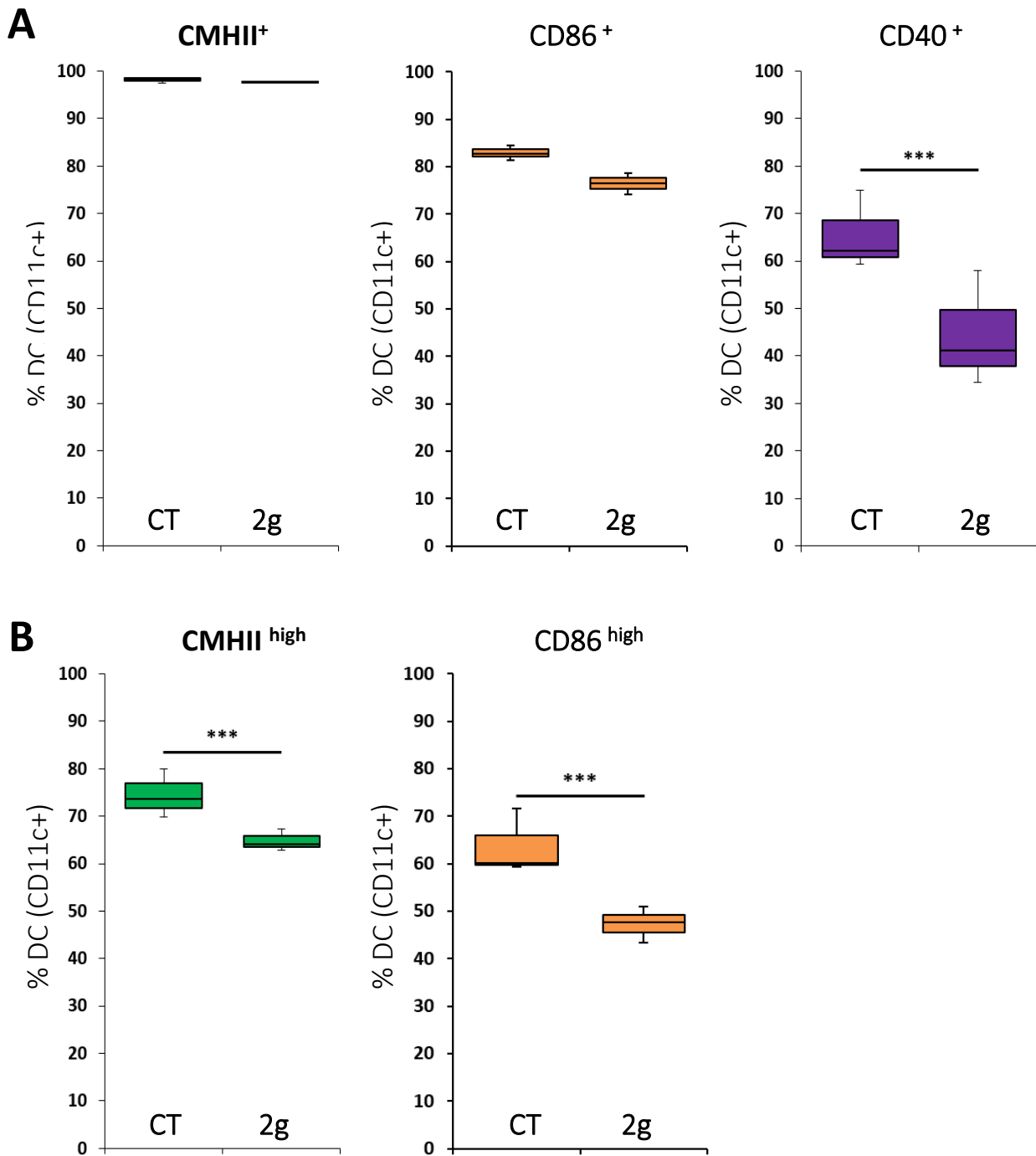
### a) Dosage de la corticostérone sérique

Dans le but d'expliquer les effets des sérums sur le phénotype d'activation/maturation des DC, nous avons dosé la corticostérone présente dans les sérums par ELISA. En effet, la corticostérone est un glucocorticoïde sécrété par les glandes surrénales en réponse à l'activation de l'axe HHS et est connue pour son effet anti-inflammatoire sur les cellules immunitaires [510]. Il est également connu que son taux va fortement augmenter de manière transitoire en réponse à stress aigu alors que l'effet d'un stress chronique peut être plus variable [240]. Nos résultats montrent qu'il n'y a aucune différence de concentration de la corticostérone dans les sérums de souris ayant subi un stress chronique, hypergravitaire ou CUMS, par rapport à leurs contrôles respectifs. Seul le stress hypergravitaire aigu entraîne une augmentation ( $\approx 30\%$ ) de la concentration de corticostérone sérique (**Figure 20**).

Ainsi, la diminution de l'expression des différents marqueurs de maturation observée dans les DC cultivées en présence de sérums provenant de souris ayant subi un stress hypergravitaire chronique ne peut pas s'expliquer par la présence de corticostérone dans ces sérums. Cependant, l'augmentation du taux de corticostérone sérique observée dans les sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire aigu pourrait expliquer les effets plus marqués de ce stress sur le phénotype des DC spléniques (**Figure 19**) par rapport au stress hypergravitaire chronique (**Figure 18**).

Ainsi, la corticostérone sérique pourrait participer à la modulation du phénotype engendrée par le stress hypergravitaire aigu mais ne semble pas jouer de rôle dans l'effet du stress hypergravitaire chronique.





**Figure 19 : Les DC spléniques exposées à des sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire aigu présentent un phénotype plus immature**

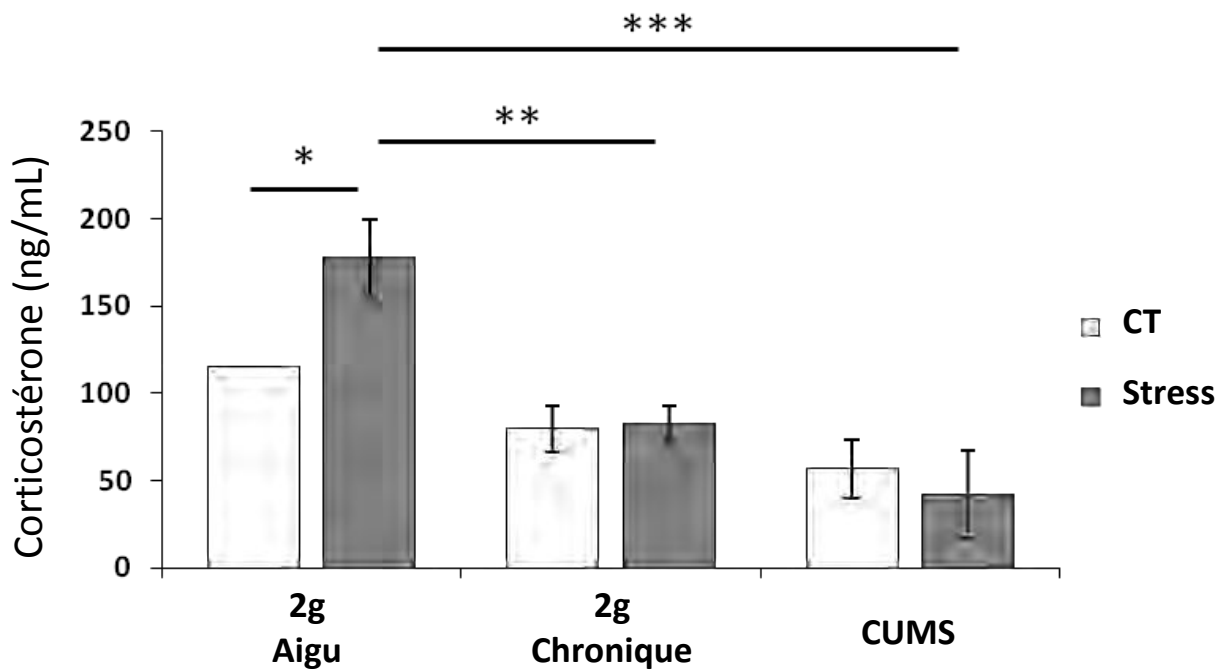
Des DC spléniques purifiées ont été cultivées en présence de sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire aigu (2g ; 3h) ou non (CT). Après 24h, un marquage de CD11c, CMHII, CD40 et CD86 a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules CD11c<sup>+</sup> (DC) exprimant le marqueur au total (**A**) ou le plus fortement (**B**).  $N = 3$  ;  $n = 3$  par groupe et par expérience. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### *b) Criblage des cytokines présentes dans les sérums de souris exposées au stress hypergravitaire*

La corticostérone sérique ne pouvant pas expliquer à elle seule l'impact des sérums de souris soumises à un stress hypergravitaire sur le phénotype des DC spléniques, nous avons étudié l'éventuelle présence de cytokines pouvant limiter l'activation/maturation des DC dans ces sérums. Pour cela, nous avons réalisé un cytokine array (méthode semi-quantitative) permettant un criblage de la présence d'un grand nombre de cytokines dans ces sérums. Dans le cas des sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire aigu (**Figure 21**), aucune cytokine détectée ne semble présenter de variation importante par rapport aux sérums provenant des souris contrôles. Seule C5a, une anaphylatoxine appartenant au système du complément, augmente de 60% dans les sérums de souris stressées par rapport à ceux des souris contrôles et ce composé est connu pour avoir un effet pro-inflammatoire menant à l'activation des cellules du SI [740]. Il y a également une augmentation plus mineure des cytokines IL-1 et IL-16 qui sont elles aussi pro-inflammatoires. L'ensemble des molécules dont l'expression est modulée sont pro-inflammatoires et tendent à augmenter. Par conséquent, ces molécules ne peuvent pas expliquer le phénotype plus immature des DC spléniques exposées aux sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire aigu.

Concernant les sérums issus de souris ayant subi un stress hypergravitaire chronique (**Figure 22**), nous observons un profil cytokinique différent avec une tendance générale à la diminution contrairement au stress hypergravitaire aigu. En effet, nous observons une diminution de C5a ainsi que de l'IL-1. Ces deux cytokines ayant des propriétés pro-inflammatoires, leur diminution pourrait participer à la mise en place du phénotype plus immature des DC spléniques exposées aux sérums issus de souris ayant subi un stress hypergravitaire chronique. Il est également possible que les altérations phénotypiques observées proviennent d'un état général de la production cytokinique plutôt qu'à la variation de la quantité de quelques molécules. En effet, il est possible que la cellule produise une quantité légèrement plus importante de nombreuses cytokines anti-inflammatoires ou, à l'inverse, qu'elle produise de nombreuses cytokines pro-inflammatoires en quantité plus faible.

Les résultats préliminaires obtenus par cette approche n'ont pas permis de dégager de manière franche des signatures cytokiniques pouvant expliquer les changements



**Figure 20 : Seul le stress hypergravitaire aigu entraine une augmentation de la corticostérone sérique**

Dosage ELISA de la corticostérone sérique de souris exposées (Stress) ou non (CT) à des stress de différentes natures: Hypergravitaire (2g aigu ou chronique ; 3h ou 21j) ou socio-environnementale (CUMS) .

$n = 3$  (2g aigu) ;  $n = 8$  (2g chronique) et  $n = 3$  (CUMS). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

phénotypiques des DC incubées en présence de sérums provenant des souris soumises à un stress hypergravitaire aigu ou chronique.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de montrer que les sérums de souris soumises à un stress hypergravitaire aigu ou chronique entraînent une diminution de l'expression des marqueurs d'activation/maturation des DC. L'apparition de ce phénotype plus immature n'est pas observée avec les sérums provenant de souris soumises à un stress de type socio-environnemental, mettant ainsi en évidence les différences qui peuvent exister entre différents types de stress. Bien que n'ayant pas été en mesure d'identifier le ou les facteur(s) plasmatique(s) à l'origine des altérations phénotypiques observées, nos résultats montrent que les DC semblent sensibles au stress gravitaire.

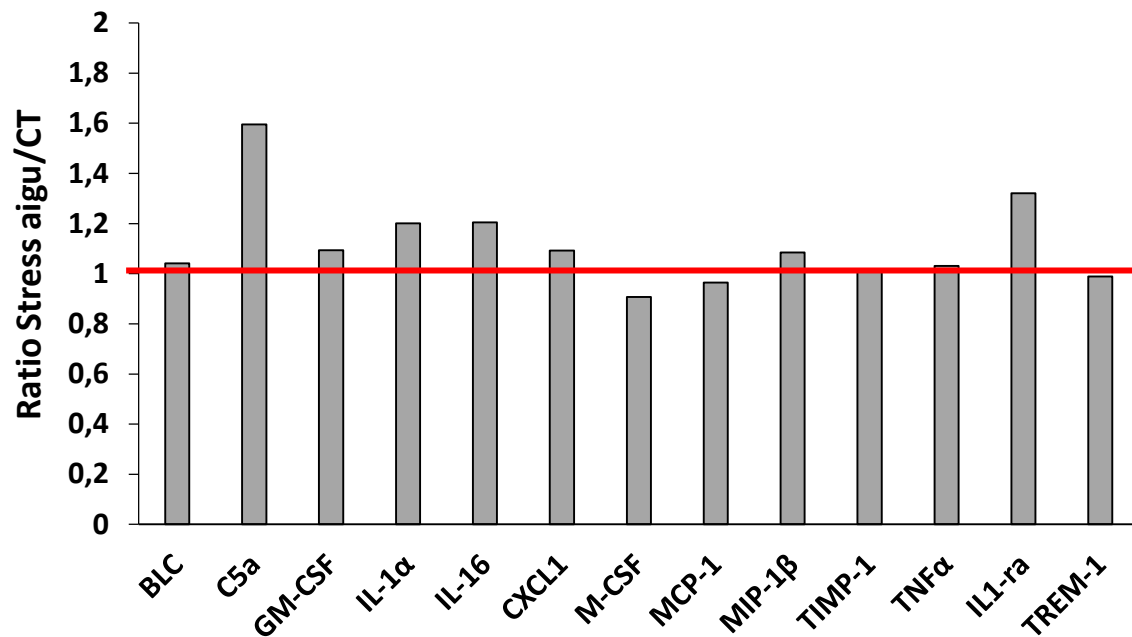
### **B. Effets d'un stress microgravitaire sur les DC**

Compte tenu de la complexité que peut représenter le contenu d'un sérum, nous avons voulu étudier les effets d'un stress mécanique directement sur les DC en nous affranchissant de tout autre facteur (e.g. environnement hormonal et cytokinique). Pour cela, nous avons choisi de soumettre, *in vitro*, des DC à une microgravité simulée, de l'ordre de  $10^{-3}$  g, grâce à la random positioning machine (RPM).

Dans ce contexte, nous avons utilisé des DC différenciées à partir de moelle osseuse (BMDC) durant 7 jours avec du Flt3L et/ou des DC isolées à partir de rate de souris. De plus, afin d'étudier les effets du stress microgravitaire sur le processus d'activation/maturation des DC, leur activation/maturation a été induite ou non par ajout de lipopolysaccharides (LPS). Le LPS est un composé bactérien connu pour augmenter l'expression membranaire des marqueurs phénotypiques étudiés [741,742].

Dans un premier temps, nous avons souhaité nous intéresser aux facteurs connus pour être impactés par la microgravité simulée sur d'autres types cellulaires tels que le cytosquelette d'actine [655,743–747] et l'apoptose [657,674,677].

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets du stress microgravitaire sur le phénotype d'activation/maturation des DC afin de comparer les résultats à ceux observés avec les sérums provenant de souris soumises à un stress hypergravitaire. Enfin, l'impact de la microgravité sur la fonction de présentation des DC a été analysé.



**Figure 21 : Profil cytokinique des sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire aigu**

Les cytokines présentes dans les sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire ou non ont été analysées par cytokine array. Une membrane a été incubée avec un mélange de trois sérums issus de souris ayant subi un stress hypergravitaire aigu et une autre a été exposée à un mélange de trois sérums de souris contrôles (CT). Le graphique représente les valeurs obtenues pour la membrane stress aigu normalisées par rapport à celles de la membrane CT. A noter que l'IL1-ra était présente uniquement sur la membrane « stress aigu » tandis que TREM-1 n'était détectée que dans la condition contrôle. N = 1 ; n = 1 mélange de 3 sérums.

## 1) Effets de la microgravité simulée sur le cytosquelette et l'apoptose des DC

### *a) Impact de la RPM sur le cytosquelette d'actine des DC*

La microgravité a été montrée pour affecter le cytosquelette d'actine dans de nombreux types cellulaires [744–750]. De plus, le cytosquelette est essentiel à de nombreux processus cellulaires.

Nous avons donc étudié le cytosquelette d'actine des BMDC et des DC spléniques exposées ou non à la RPM en présence ou en absence de LPS.

Dans les BMDC et les DC spléniques, nos résultats (**Figure 23**) montrent, respectivement, une diminution ou une tendance à la diminution ( $p = 0,0704$ ) de l'actine polymérisée dans les cellules exposées à la microgravité simulée, en absence de LPS, par rapport aux DC cultivées en normogravité.

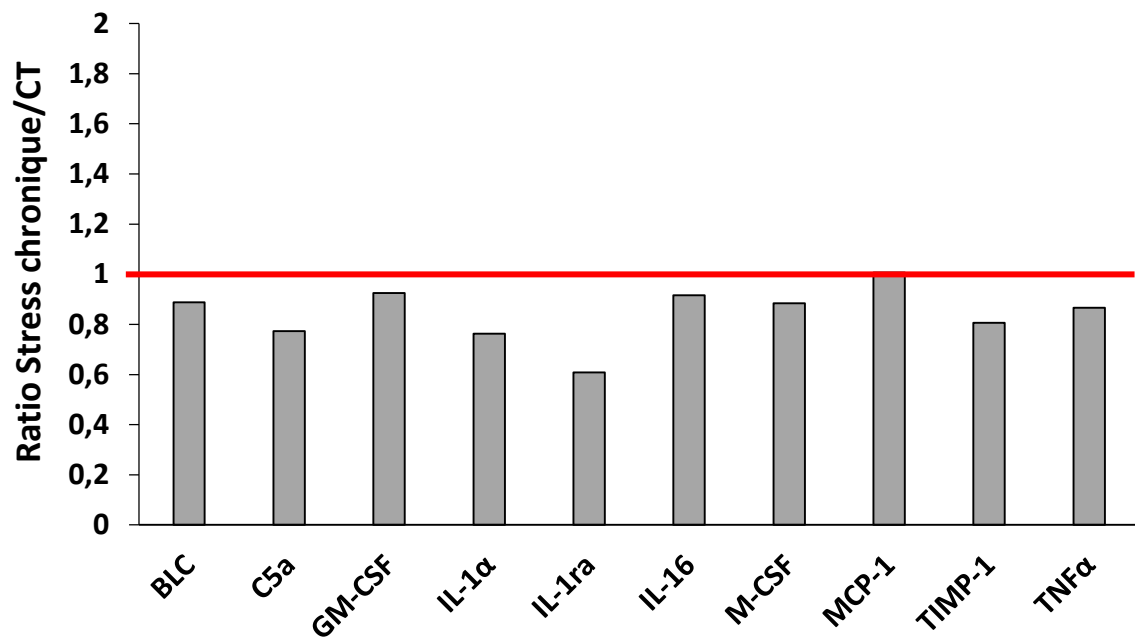
De manière intéressante, une stimulation des DC avec du LPS a des effets différents en fonction de la population cellulaire étudiée. En effet, une augmentation de la quantité d'actine polymérisée est observée dans les BMDC activées/maturées en condition RPM par rapport aux BMDC contrôles. A l'inverse, dans les DC spléniques, l'altération de polymérisation de l'actine persiste malgré l'activation des cellules (**Figure 23B**).

Le stress microgravitaire entraîne donc une diminution de la polymérisation du cytosquelette d'actine dans les DC immatures. L'altération de la polymérisation du cytosquelette d'actine persiste malgré l'induction de l'activation/maturation dans les deux populations cellulaires se traduisant dans un cas par une augmentation de la quantité d'actine polymérisée et dans l'autre cas par une diminution. Ces résultats mettent donc en évidence que le stress microgravitaire affecte le cytosquelette d'actine des DC.

### *b) Impact de la RPM sur la survie des DC.*

#### **i. Etude de l'apoptose des BMDC et DC spléniques**

Nous avons ensuite étudié l'impact que pouvait avoir la microgravité simulée sur la survie des BMDC et des DC spléniques (**Figure 24**). En effet, il a été montré que la microgravité entraîne une augmentation de l'apoptose de DC humaines ainsi que d'autres types cellulaires [657,674,677]. Nous avons donc marqué des BMDC et des DC spléniques exposées ou non à 24h de RPM en présence ou en absence de LPS en utilisant l'annexine V (apoptose) et le 7AAD (nécrose).



**Figure 22 : Profil cytokinique des sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire chronique**

Les cytokines présentes dans les sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire ou non ont été analysées par cytokine array. Une membrane a été incubée avec un mélange de trois sérums issus de souris ayant subi un stress hypergravitaire chronique et une autre a été exposée à un mélange de trois sérums de souris contrôles (CT). Le graphique représente les valeurs obtenues pour la membrane stress aigu normalisées par rapport à celles de la membrane CT. N = 1 ; n = 1 mélange de 3 sérums.

Les résultats (**Figures 24**) montrent, que ce soit pour les BMDC ou les DC spléniques, que le stress microgravitaire induit une diminution du nombre de DC vivantes ( $AnxV^{-}7AAD^{-}$ ), d'environ 10%, au profit d'une augmentation des DC apoptotiques ( $AnxV^{+}/7AAD^{+/-}$ ). De manière intéressante, cette différence n'est plus retrouvée lorsque les DC sont activées. De plus, la part de cellules nécrotiques ( $AnxV^{-}7AAD^{+}$ ) reste négligeable.

Il est à noter que, contrairement aux DC spléniques, l'activation des BMDC semble favoriser la survie des cellules par rapport à la condition non activée au LPS (env. 65% de BMDC activées vivantes contre 37% en absence de LPS).

Pris ensemble, ces résultats montrent que la microgravité simulée provoque une légère augmentation de l'apoptose des DC spléniques et des BMDC murines et que leur activation au LPS semble avoir un effet protecteur.

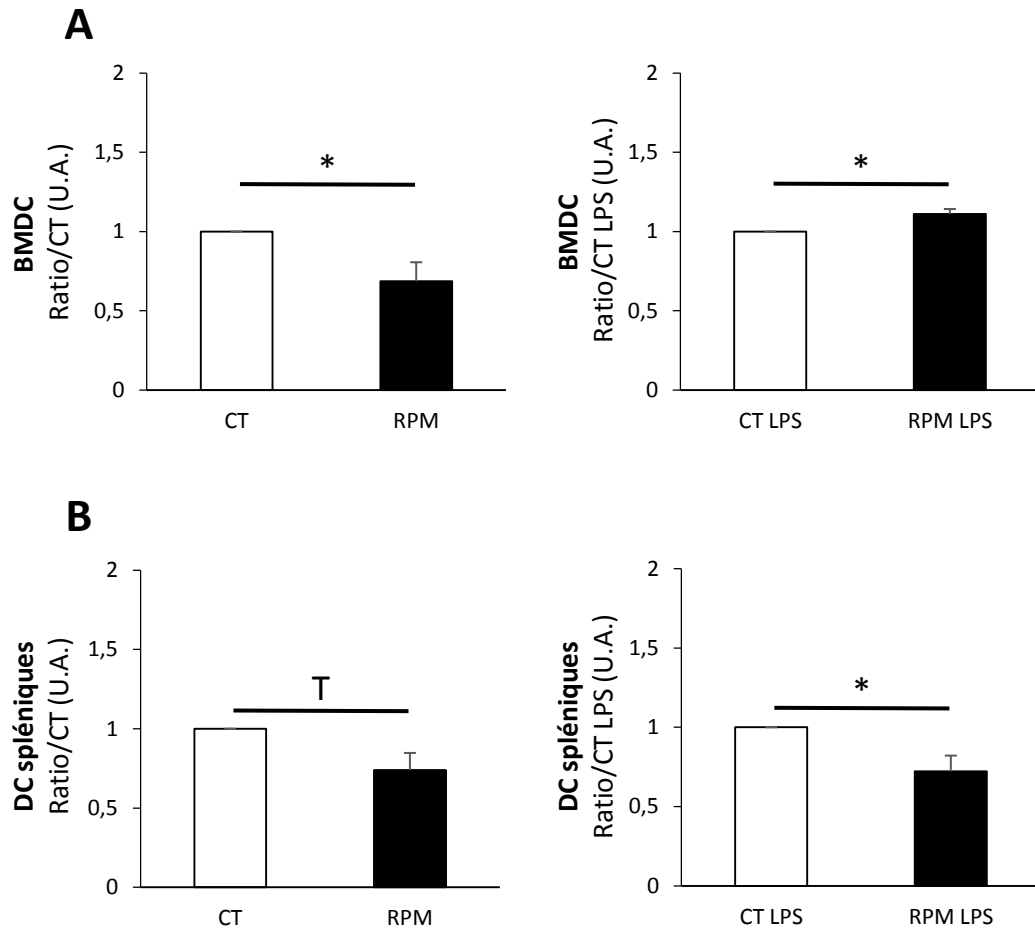
## ii. Impact d'une variation de la concentration cellulaire sur la viabilité des BMDC

Les contacts intercellulaires étant importants pour la régulation de nombreuses fonctions cellulaires comme la survie [751,752], nous avons voulu évaluer l'influence de ces derniers dans l'augmentation de l'apoptose des DC soumises à un stress microgravitaire. En effet, lorsque les cellules sont cultivées en RPM, il y a absence de sédimentation contrairement aux cellules contrôles cultivées en condition normogravitare et donc diminution des contacts cellulaires.

Afin de répondre à cette question, des cellules ont été cultivées à des concentrations croissantes dans le but d'augmenter les probabilités de contacts cellulaires dans la plaque cultivée en condition RPM. Cette expérience, requérant un grand nombre de cellules, a été réalisée seulement avec des BMDC qui peuvent être obtenues en grande quantité par rapport aux DC spléniques. Nous avons donc cultivé des DC différenciées à partir de moelle osseuse durant 24h en microgravité simulée à différentes concentrations :  $2 \times 10^6$  BMDC/mL ;  $4 \times 10^6$  BMDC/mL et  $6 \times 10^6$  BMDC/mL. Comme précédemment, les cellules ont ensuite été marquées avec de l'annexine V et du 7AAD.

Nous avons pu montrer que le fait d'augmenter les concentrations des BMDC n'avait aucune incidence sur l'apoptose que ce soit des BMDC non activées ou des BMDC activées au LPS et cultivées en RPM (**Figure 25**). Ces résultats nous amènent à penser que l'augmentation de la concentration et donc du contact cellulaire n'a pas d'effet sur la survie des BMDC.





**Figure 23 : La microgravité simulée altère le cytosquelette d'actine des DC**

Les BMDC (A) et DC spléniques (B) ont été cultivées en condition de microgravité simulée (RPM) ou non (CT) en absence (panneau gauche) ou en présence (panneau droit) de LPS. Après 24h, un marquage membranaire du CD11c suivi d'un marquage intracellulaire de l'actine polymérisée (F-Actine) par la phalloïdine a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les graphiques représentent l'intensité de marquage (médiane) par rapport au CT (Ratio/CT) de la phalloïdine dans les cellules CD11c+. N=4 (A) N=3 (B) ; n= 3 par groupe et par expérience. RPM=Random Positioning Machine; LPS = Lipopolysaccharide ; U.A = Unités Arbitraires \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001. .

Pris ensemble, ces résultats montrent que l'augmentation des contacts cellulaires n'a pas d'effet sur l'apoptose des BMDC soumises à la microgravité. Par conséquent, l'effet pro-apoptotique observé en **Figure 24** semble bien dû à la microgravité simulée.

## 2) Impact du stress microgravitaire sur le phénotype d'activation/ maturation des DC

Nous avons précédemment montré que le phénotype d'activation/maturation des DC était sensible à certains facteurs présents dans les sérums de souris soumises à un stress hypergravitaire aigu ou chronique. Dans ce contexte, nous avons donc voulu évaluer si les mêmes effets pouvaient être observés lorsque les DC sont directement soumises à un stress gravitaire.

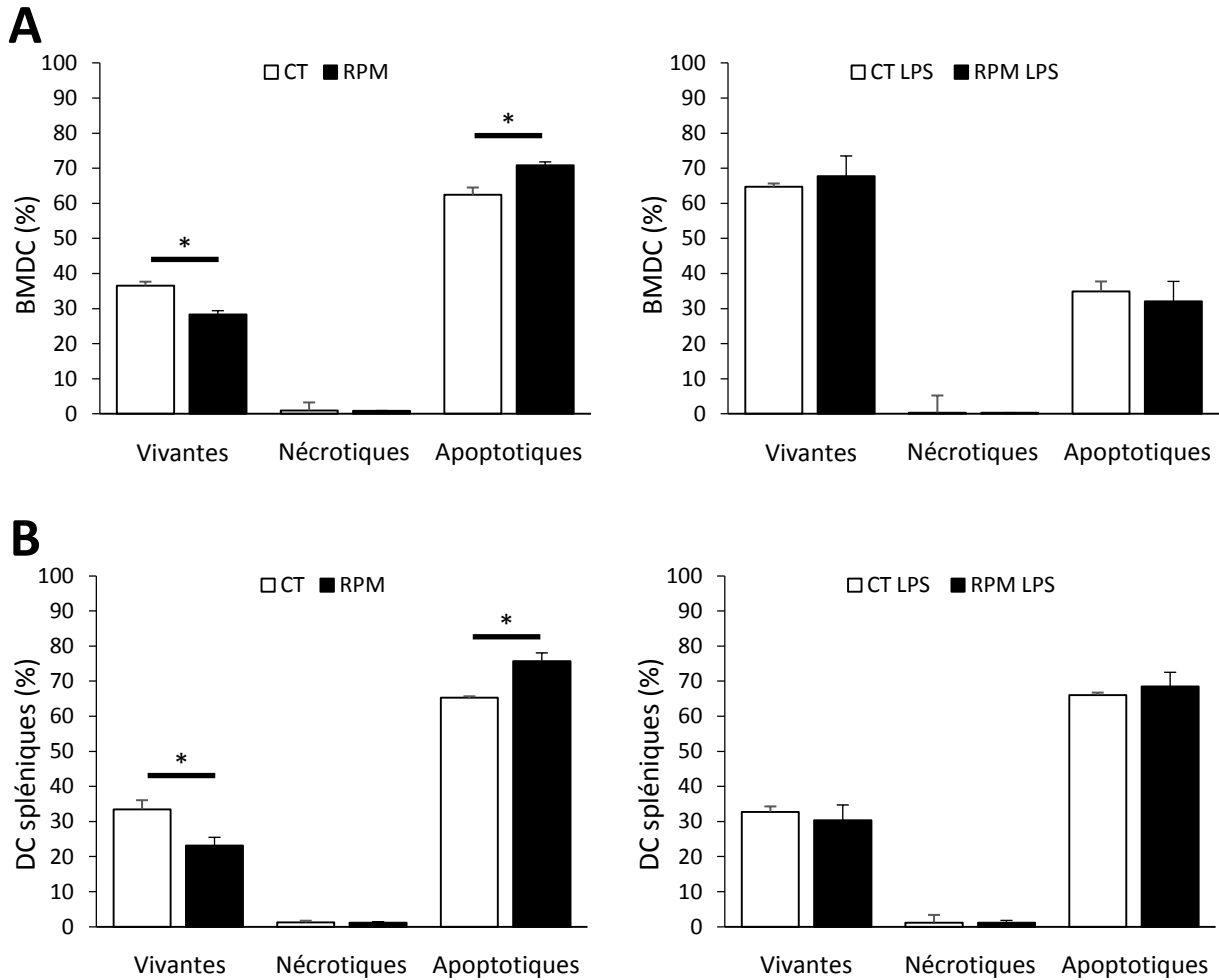
Pour cela, des BMDC et des DC spléniques ont été cultivées en condition de microgravité simulée (RPM) ou non (CT) et en présence ou en absence de LPS. Après 24h de culture, le phénotype des BMDC et des DC spléniques a été étudié par cytométrie en flux. L'analyse de l'expression de CD80, une 3<sup>ème</sup> molécule de co-stimulation, a été ajoutée à notre panel. Dans cette étude, le pourcentage de DC positives pour les différents marqueurs mais également leur intensité médiane d'expression membranaire ont été analysés. Ce dernier paramètre nous a permis d'étudier les variations d'expression membranaire tout en prenant en compte la distribution des populations ayant différents niveaux d'expression.

L'étude de ces deux paramètres (pourcentage de cellules positives et intensité médiane d'expression) nous permettra de mettre en évidence si la microgravité simulée par RPM peut impacter la proportion de la population de DC exprimant ces marqueurs mais également leur quantité à leur surface.

### a) Effets du stress microgravitaire sur les BMDC

Nos résultats montrent (**Figure 26**) qu'en absence de LPS, la RPM induit une diminution significative de la proportion de BMDC exprimant CD40 ainsi qu'une diminution de l'intensité d'expression membranaire du CMHII, de CD40 et de CD86. La RPM provoque donc une diminution de l'expression membranaire de l'ensemble des marqueurs étudiés à l'exception de CD80.

Lorsque les BMDC sont maturées/activées par ajout de LPS, nous observons que la RPM n'a aucun effet sur le pourcentage de cellules positives pour les marqueurs étudiés. Toutefois, nous avons observé une augmentation de la médiane d'intensité de fluorescence du CMHII



**Figure 24 : La microgravité simulée diminue la survie des DC uniquement en absence d'activation au LPS**

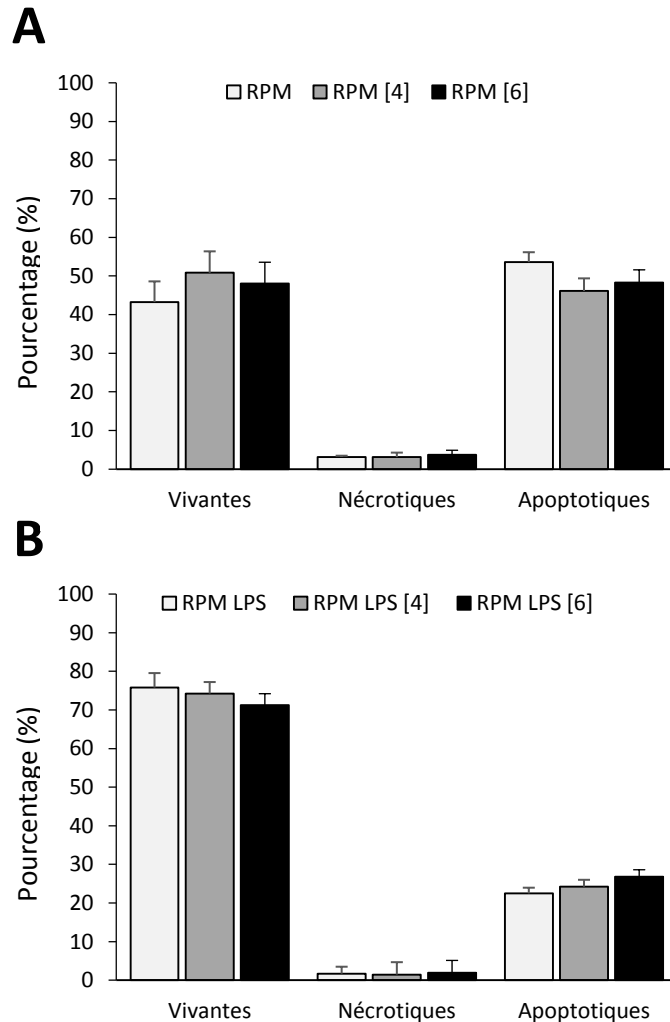
Les BMDC (A) et DC spléniques (B) ont été cultivées en condition de microgravité simulée (RPM) ou non (CT), en absence (panneau gauche) ou en présence de LPS (panneau droit). Après 24h, un marquage AnxV et 7AAD a été réalisé suivi par des expériences de cytométrie en flux. Les cellules vivantes correspondent aux cellules AnxV-7AAD-, les cellules nécrotiques sont Anx-7AAD+ et les cellules en phase précoce et tardive d'apoptose sont Anx+ et notées apoptotiques. N=4 (A) N=3 (B) ; n=3 par groupe et par expérience. RPM=Random Positioning Machine; LPS=Lipopolysaccharide \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

et de CD40 traduisant une augmentation de la quantité de ces marqueurs à la surface des cellules. Il semblerait donc que, dans les BMDC activées, le stress microgravitaire n'entraîne pas d'effets négatifs sur l'expression des marqueurs contrairement à ceux observés en condition basale, mais impacterait néanmoins leur régulation.

Sachant que la différenciation des DC avec du Flt-3L permet l'obtention de BM-cDC (env. 60 à 80%) et de BM-pDC (env. 20 à 40%), nous avons souhaité savoir quelle sous-population était impactée par la RPM. Pour cela, grâce à l'expression différentielle de mPDCA1 (mouse Plasmacytoid Dendritic Cell Antigen-1), nous avons pu analyser l'impact de la microgravité simulée sur les BM-cDC CD11c<sup>+</sup>mPDCA1<sup>-</sup> et les BM-pDC CD11c<sup>+</sup>mPDCA1<sup>+</sup> séparément (**Figure 27**).

Ainsi, les résultats obtenus mettent en évidence, dans les cellules non activées, une diminution de la population de BM-cDC exprimant CD40 ainsi qu'une tendance ( $p = 0,0682$ ) à la diminution de la population de BM-cDC exprimant CD80 (**Figure 27**). Nous observons également une diminution de l'intensité médiane d'expression de l'ensemble des marqueurs membranaires étudiés (CMHII, CD40, CD80 et CD86) dans les BM-cDC soumises à la microgravité par rapport aux cellules contrôles. Toutefois, la diminution de l'expression de l'ensemble des marqueurs est contrecarrée par l'activation des cellules. De manière intéressante, les BM-pDC (CD11c<sup>+</sup>mPDCA1<sup>+</sup>) ne semblent pas être impactées par le stress microgravitaire puisqu'aucune différence phénotypique n'a été observée et ce quel que soit le marqueur étudié. La majorité des BMDC obtenues après différenciation étant des BM-cDC, les altérations phénotypiques des BMDC observées en condition de microgravité simulée proviennent donc de l'impact de cette dernière sur les BM-cDC.

Pris ensemble, ces résultats montrent que le stress microgravitaire impacte particulièrement les BM-cDC en condition non activées, en entraînant l'apparition d'un phénotype plus immature caractérisé par la diminution de leur état d'activation/maturation. Ainsi, l'effet du stress gravitaire, appliqué directement sur les BMDC, semble comparable à celui induit sur des DC spléniques par les facteurs solubles présents dans des sérums de souris soumises à ce type de stress.



**Figure 25 : L'augmentation de la concentration des BMDC ne semble pas avoir d'impact majeur sur l'apoptose**

Les BMDC ont été cultivées en condition de microgravité simulée (RPM), en absence **(A)** ou en présence de LPS **(B)** à différentes concentrations:  $2 \times 10^6$ ;  $4 \times 10^6 = [4]$  et  $6 \times 10^6 = [6]$ . Après 24h, un marquage AnxV et 7AAD a été réalisé suivi par des expériences de cytométrie en flux. Les cellules vivantes correspondent aux cellules AnxV-7AAD-, les cellules nécrotiques sont Anx-7AAD+ et les cellules en phase précoce et tardive d'apoptose sont Anx+ et notées apoptotiques. N=3; n= 2 par groupe et par expérience. RPM=Random Positioning Machine; LPS = Lipopolysaccharide \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001. .

## *b) Effets du stress microgravitaire sur les DC spléniques*

### **i. Expression des marqueurs d'activation/maturation des DC spléniques**

Nous avons montré que des DC spléniques exposées à des sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire présentaient un phénotype plus immature. Nous avons également constaté une diminution de l'état d'activation/maturation des BM-cDC due à un impact du stress microgravitaire. Nous nous sommes alors demandé si la microgravité simulée pouvait altérer le phénotype de DC spléniques purifiées. Ces dernières présentent une expression basale des marqueurs CMHII, CD40, CD80 et CD86 plus importante que les BMDC et sont également capables de s'activer en présence de LPS. Nous avons donc purifié des DC spléniques (cDC) que nous avons cultivé en présence de LPS ou non durant 24h en condition de microgravité simulée par RPM ou non.

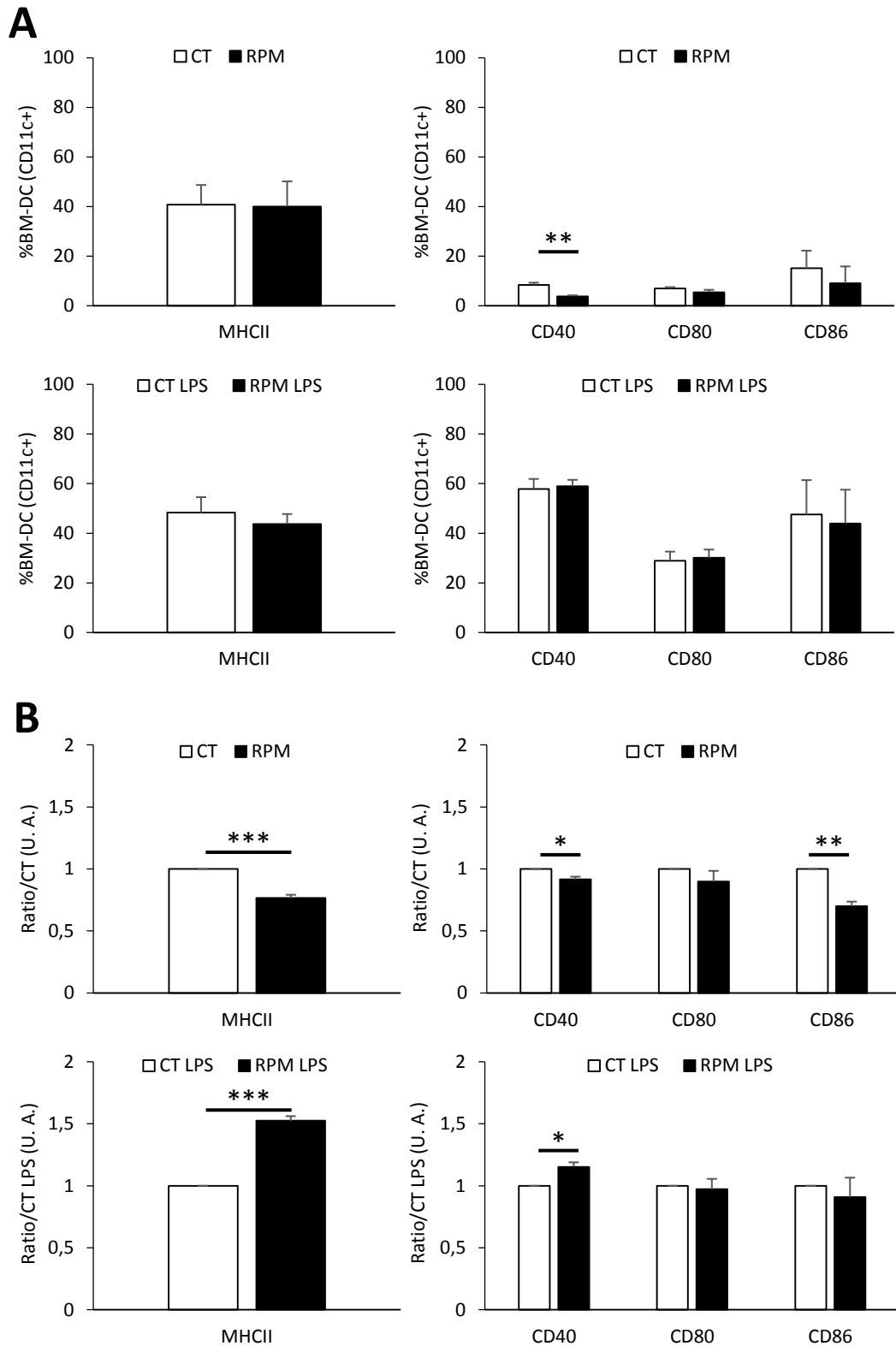
En absence de LPS, les résultats montrent que la RPM entraîne une diminution du pourcentage des DC spléniques exprimant CD40 et CD80 ainsi qu'une diminution de la quantité d'expression membranaire pour CD80 et CD86 (**Figure 28**). De manière intéressante et comme pour les BMDC, en présence de LPS, la RPM n'a pas d'effet sur les proportions de DC spléniques exprimant les marqueurs étudiés. Toutefois, contrairement aux BMDC, la RPM diminue la quantité de molécules CD40, CD80 et CD86 exprimées à la surface des DC spléniques (médiane) activées au LPS. Ces résultats suggèrent que les DC spléniques, cultivées en microgravité simulée en présence de LPS, s'activent de manière moins importante qu'en condition normogravitaires puisque la médiane reste moins élevée pour les molécules de co-stimulation.

Nous avons donc montré que, bien que la microgravité simulée n'impacte pas l'expression membranaire du CMHII, elle induit une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation en condition activée ou non.

Ainsi, les DC spléniques et les BMDC exposées à un stress microgravitaire présentent un phénotype plus immature. Une fois activées/maturées, les effets du stress microgravitaire, bien que différents en fonction du type de DC, altèrent la régulation de l'expression de certains marqueurs d'activation/maturation.

### **ii. Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires**

Un phénotype membranaire plus immature est souvent associé à une faible production de cytokines pro-inflammatoires [157]. Nous avons par conséquent étudié la quantité de



**Figure 26 : Les BMDC exposées à la RPM présentent un phénotype plus immature mais l'induction de leur maturation/activation ne semble pas impactée par le stress microgravitaire**

Des BMDC différenciées durant 7 jours par traitement au Flt3L ont été cultivées en condition de microgravité simulée (RPM) ou non (CT), en absence (panneaux du haut) ou en présence (panneaux du bas) de LPS. Après 24h, un marquage de CD11c, CMHII, CD40, CD80 et CD86 a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules positives **(A)** ou la médiane de l'intensité de marquage **(B)** des différents marqueurs phénotypiques exprimés par les cellules CD11c+. N = 3 ; n = 3 par groupe et par expérience. RPM=Random Positioning Machine; LPS = Lipopolysaccharide \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

diverses cytokines présentes dans les surnageants de culture des DC spléniques exposées ou non à la RPM par cytokine array (méthode semi-quantitative).

Des expériences préliminaires (N = 2) ont permis de mettre en évidence une diminution de près de 50% des cytokines IP-10, MCP-1 et IL-6 dans les surnageants des DC spléniques cultivées en RPM par rapport aux CT (**Figure 29**). Ces trois cytokines étant pro-inflammatoires, cela nous amène à penser que les DC spléniques exposées à la RPM présentent bien un phénotype plus immature puisqu'elles expriment moins de molécules de co-stimulation et produisent moins de cytokines pro-inflammatoires.

### iii. Impact de la microgravité simulée par RPM sur la quantité de transcrits des marqueurs d'activation/maturation des DC

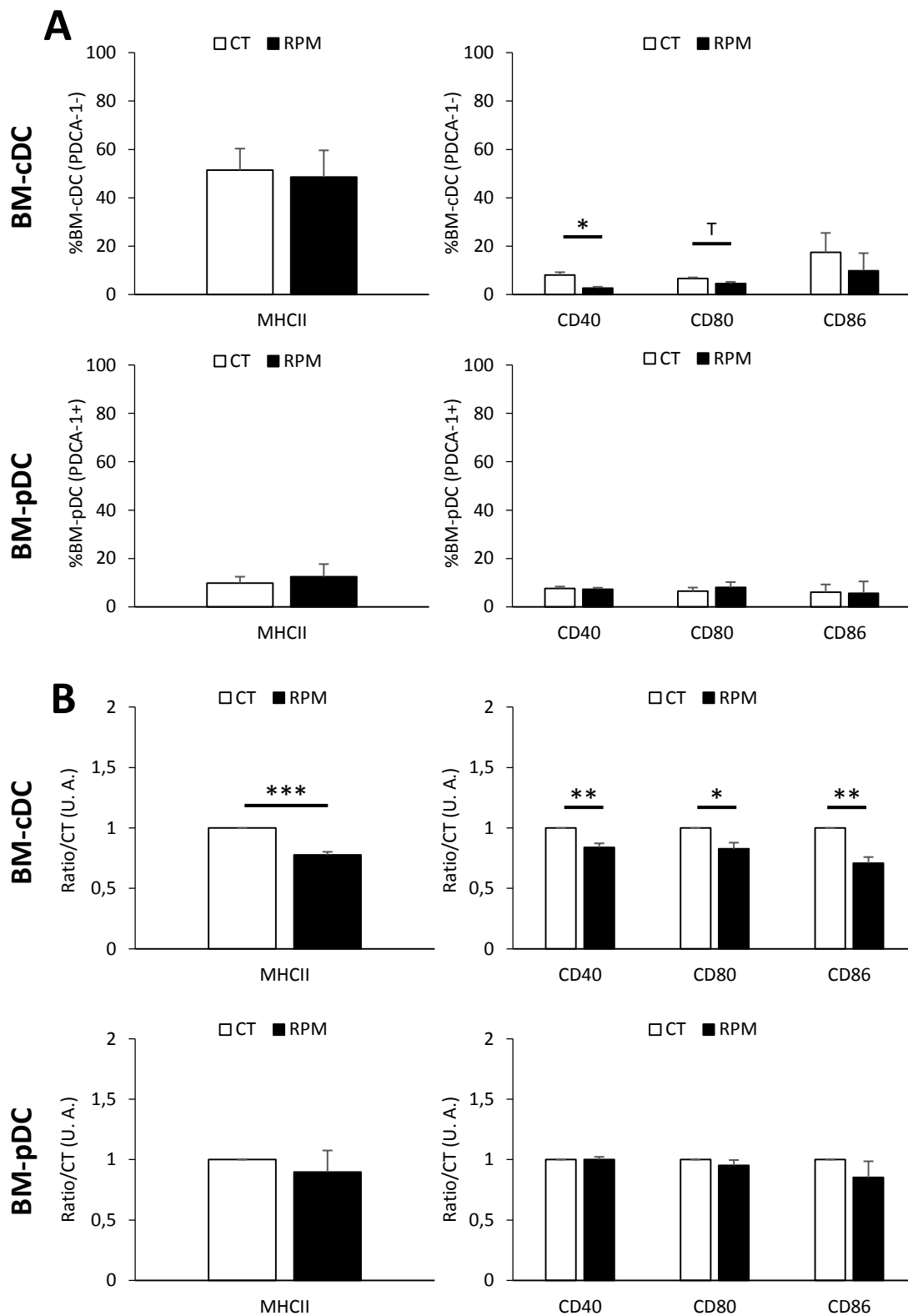
Dans le but d'expliquer les variations d'expression membranaire des marqueurs d'activation/maturation, nous avons étudié les effets du stress microgravitaire sur la quantité de transcrits desdits marqueurs. En effet, des altérations transcriptionnelles ont été montrées à la fois dans différents modèles de microgravité simulée ainsi qu'en condition de microgravité réelle et ce, sur plusieurs types cellulaires [393,670,753–758]. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de RT-qPCR sur les ARNm de DC spléniques et de BMDC exposées ou non à la RPM durant 24h en présence ou en absence de LPS.

#### ➤ *Dans les BMDC*

Dans le cas des BMDC, nous avons mis en évidence une diminution de quantité des transcrits de l'ensemble des marqueurs étudiés après 24h de RPM (**Figure 30A**). La diminution de l'expression membranaire des marqueurs (**Figure 26**) pourrait par conséquent s'expliquer par une diminution de l'expression de leurs transcrits.

De manière intéressante, cette diminution de transcrits est également retrouvée dans des BMDC activées au LPS excepté pour le marqueur CMHII (**Figure 30B**). Toutefois, les expériences de cytométrie en flux nous avaient montré que ni le pourcentage de BMDC positives pour les marqueurs, ni la quantité de marqueur à leur surface n'étaient diminués en condition LPS (**Figure 26**). Ainsi, cette observation nous amène à penser que l'effet de la microgravité simulée sur le phénotype des BMDC ne corrèle que partiellement avec les altérations transcriptionnelles mises en évidence. Ainsi, la diminution de l'état d'activation/maturation des BMDC peut être expliquée par la diminution du nombre de transcrits des marqueurs étudiés uniquement dans les BMDC non activées. Il est également





**Figure 27 : La microgravité simulée altère le phénotype des BM-cDC mais pas des BM-pDC**

Des BMDC ont été cultivées en condition de microgravité simulée (RPM). Après 24h, un marquage de CD11c, mPDCA1, CMHII, CD40, CD80 et CD86 a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules positives (A) ou la médiane de l'intensité de marquage (B) des différents marqueurs phénotypiques exprimés par les cellules CD11c+ mPDCA1- (BM-cDC ; panneaux du haut) ou CD11c+ mPDCA1+ (BM-pDC ; panneaux du bas). N = 3 ; n = 3 par groupe et par expérience. RPM=Random Positioning Machine; T = 0,05 < p < 0,075 ; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

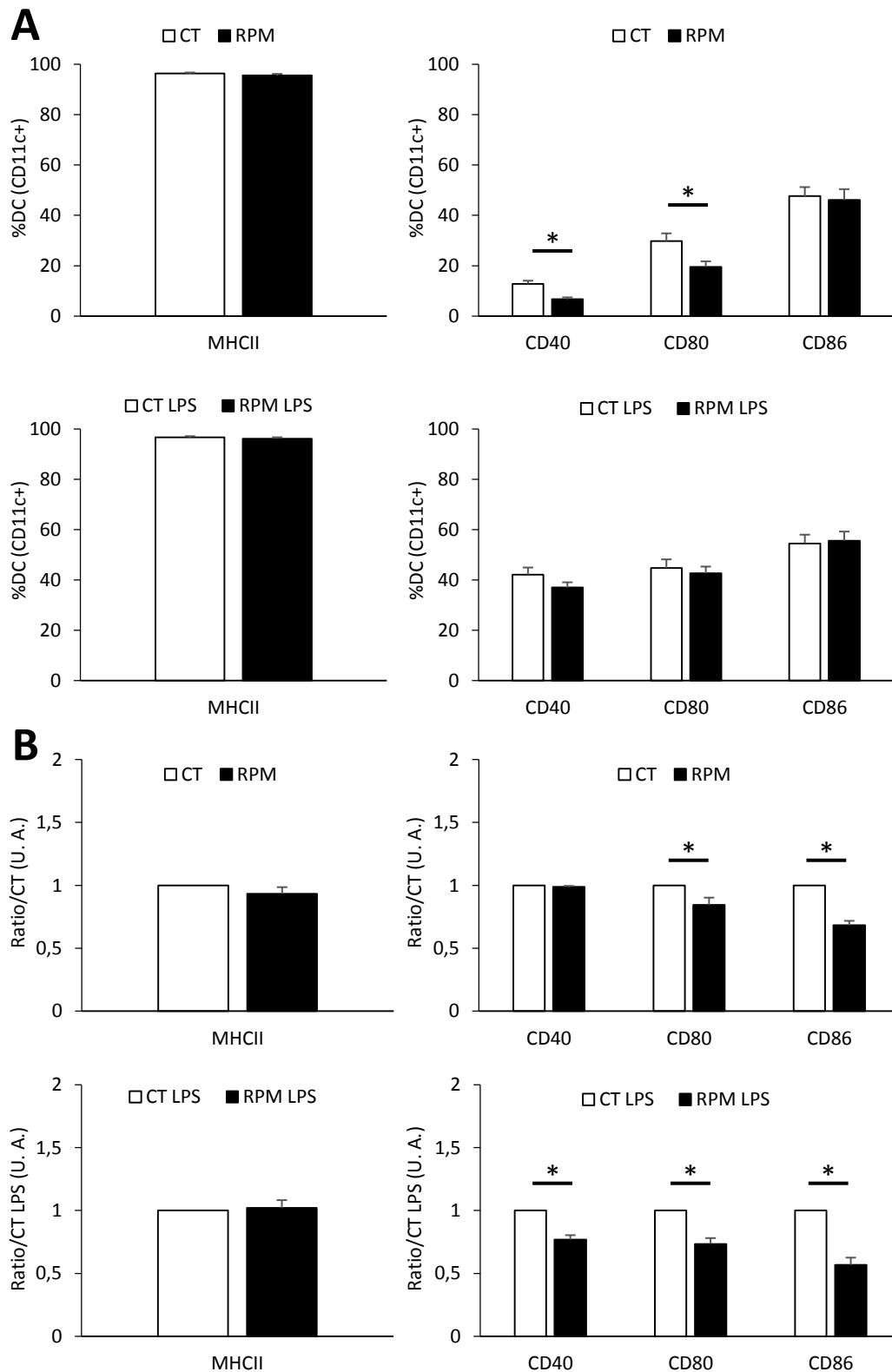
intéressant de noter que la RPM perturbe de manière importante la quantité de transcrits des marqueurs d'activation/maturation et que cet effet perdure au cours du temps puisqu'il est observé après 24h d'exposition à la microgravité simulée.

➤ *Dans les DC spléniques*

Les résultats montrent une diminution de l'expression de l'ensemble des transcrits des molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86) après 24h de RPM (**Figure 31A**) ce qui pourrait expliquer les variations phénotypiques observées par cytométrie en flux au niveau membranaire (**Figure 28**). Par contre, lorsque les DC spléniques sont activées, nous observons une augmentation des transcrits du CMHII et une diminution des transcrits de CD86. Les quantités de transcrits de CD40 et de CD80 ne semblent pas être impactées en condition activée (**Figure 31B**). Tout comme pour les BMDC, ces variations d'expression au niveau transcriptionnel ne corrèlent pas avec celles observées au niveau membranaire où il y avait diminution de l'ensemble des molécules de co-stimulation et aucune altération de la quantité de CMHII à la membrane. Les résultats obtenus par RT-qPCR en présence de LPS ne peuvent donc que partiellement expliquer ceux obtenus par cytométrie en flux.

Nous avons par conséquent pu mettre en évidence qu'en absence de LPS, la microgravité simulée entraîne une diminution de l'expression membranaire des molécules de co-stimulation des DC spléniques et que cette diminution est corrélée à une diminution de la quantité de transcrits. En présence de LPS cependant, les variations phénotypiques observées au niveau membranaire par cytométrie en flux (diminution de l'ensemble des molécules de co-stimulation ; **Figure 28**) ne peuvent être que partiellement expliquées par une altération de la quantité de transcrits (diminution de CD86 uniquement). Cela nous amène à penser que d'autres mécanismes pourraient être influencés par la microgravité simulée.

Pour conclure quant à l'effet du stress microgravitaire sur le phénotype d'activation/maturation des DC, nous avons pu mettre en évidence une diminution d'expression membranaire des marqueurs d'activation/maturation observée à la fois au niveau des DC spléniques et des BMDC. Ce phénotype plus immature semble être la conséquence d'une diminution au niveau du taux de transcrits mais uniquement en absence d'activation au LPS. En effet, lorsque les DC spléniques et BMDC sont activées/maturées au LPS, l'absence de corrélation observée entre les résultats obtenus au niveau membranaire et



**Figure 28 : Les DC spléniques exposées à la microgravité simulée présentent un phénotype plus immature**

Des DC spléniques purifiées ont été cultivées en condition de microgravité simulée (RPM) ou non (CT), en absence (panneaux du haut) ou en présence (panneaux du bas) de LPS. Après 24h, un marquage de CD11c, CMHII, CD40, CD80 et CD86 a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules positives **(A)** ou la médiane de l'intensité de marquage **(B)** des différents marqueurs phénotypiques exprimés par les cellules CD11c+.  $N = 4$  ;  $n = 3$  par groupe et par expérience. RPM=Random Positioning Machine; LPS = Lipopolysaccharide \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

ceux obtenus au niveau du taux de transcrits nous amène à penser que d'autres mécanismes cellulaires sont impactés par la RPM et que ceux-ci participent aux variations d'expression membranaire des marqueurs d'activation/maturation des DC spléniques et des BMDC.

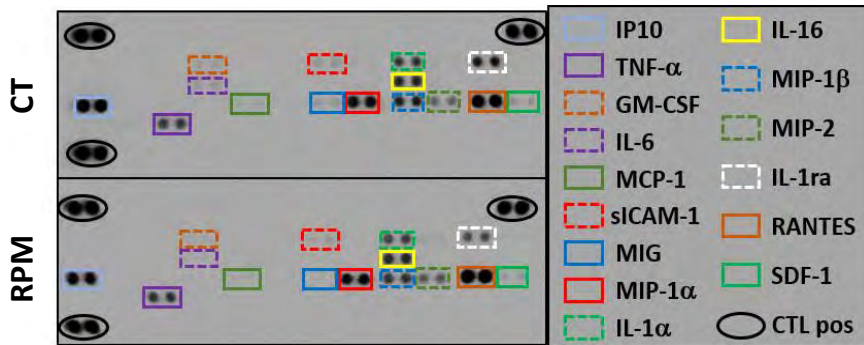
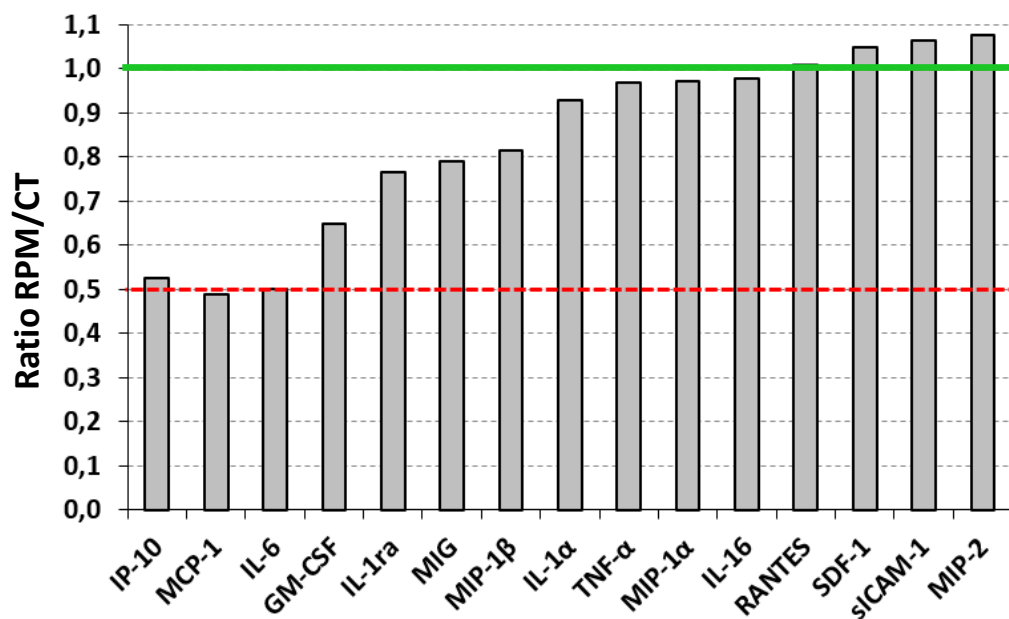
Enfin, en plus du phénotype plus immature des BMcDC et des cDC spléniques exposées à un stress microgravitaire, des expériences préliminaires ont montré que ces dernières produisent moins de cytokines pro-inflammatoires lorsqu'elles sont exposées à la RPM. Ainsi, en condition non activée, les DC exposées à la microgravité simulée présentent un phénotype d'activation/maturation diminué. Ce phénotype plus immature engendré par la RPM pourrait impacter leur fonction de présentation de l'antigène aux LT CD4<sup>+</sup>.

### 3) Effet du stress microgravitaire sur la fonction de présentation antigénique des DC spléniques

Nous avons observé que les DC spléniques cultivées en RPM présentaient un phénotype plus immature que celles cultivées en normogravité. En effet, une diminution de la quantité de molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86) à leurs surfaces et de la production de certaines cytokines pro-inflammatoires (IP-10, MCP1 et IL-6) ont été observées. De plus, nous avons montré que le stress microgravitaire induisait une altération du cytosquelette d'actine.

La présentation de l'antigène ainsi que l'activation des LT CD4<sup>+</sup> par les DC dépend de la formation d'une structure particulière appelée synapse immunologique. Cette zone de contact étroit entre LT et DC est caractérisée par de nombreuses interactions moléculaires (en partie assurées par les molécules de co-stimulation) ainsi que par une modification de la morphologie des DC. Les molécules de co-stimulation ainsi que le cytosquelette d'actine vont donc jouer un rôle important dans la formation de la synapse immunologique. Comme le stress microgravitaire altère ces paramètres, nous avons par conséquent étudié ses effets sur leur fonction de présentation antigénique.

Pour cela, des DC spléniques ont été marquées avec un traceur bleu (Cell Tracker Blue : CTB) et cultivées durant 24h en microgravité simulée en présence d'ovalbumine de poulet (Ova = Ag) ou non. Après récupération, les cDC ont été mises en présence de LT CD4<sup>+</sup> OT-II (LT transgéniques reconnaissant spécifiquement l'Ova) durant 20 ou 60 minutes. La formation de synapses immunologiques entre DC et LT a ensuite été observée par microscopie à fluorescence après marquage de LFA-1, une intégrine se relocalisant au niveau de la synapse immunologique (**Figure 32**). Plusieurs paramètres ont été étudiés : le nombre de DC (= CPA),

**A****B**

**Figure 29 : Les DC spléniques cultivées en condition de microgravité simulée produisent moins de cytokines pro-inflammatoires (IP-10, MCP-1 et IL-6)**

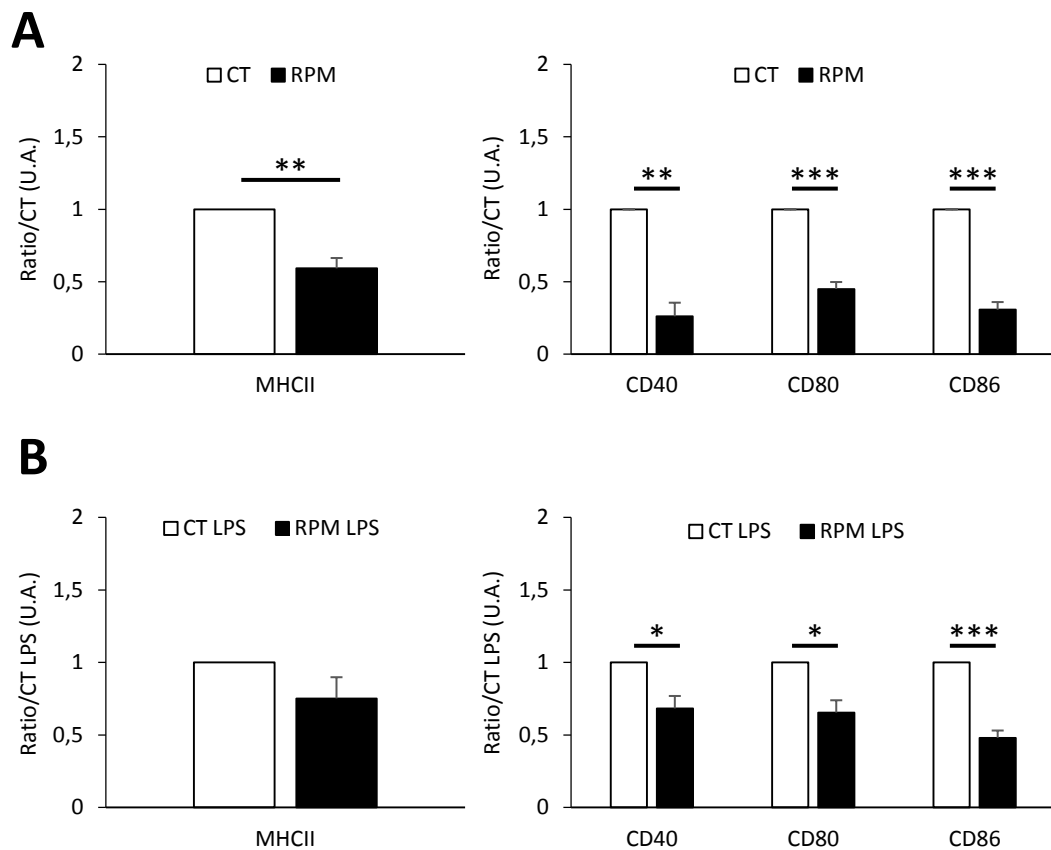
Les cytokines présentes dans le surnageant de DC spléniques exposées ou non à la RPM ont été dosées par cytokine array. Une membrane a été incubée avec un mélange de surnageants issus de 3 puits de culture de DC en condition RPM et une autre a été exposée à un mélange de surnageants issus de 3 puits de culture de DC en condition normogravitaire (CT) (A). Le graphique (B) représente les valeurs obtenues pour la membrane RPM normalisées par rapport à la membrane CT. N = 2 ; n = 2.

le nombre de conjugués (une DC en contact avec un LT) et le nombre de synapses (un conjugué avec relocalisation de LFA-1 au niveau de la zone de contact entre LT et DC). Ces deux derniers paramètres vont nous permettre de savoir si la RPM altère la capacité des DC à entrer en contact avec les LT et/ou à former une synapse immunologique, respectivement. Les résultats montrent que les DC spléniques exposées à la RPM forment autant de conjugués (**Figure 33A**) et de synapses (**Figure 33B**) que les DC contrôles. Ceci nous amène donc à penser que le stress microgravitaire, malgré son impact sur l'expression membranaire des molécules de co-stimulation et le cytosquelette d'actine, ne semble pas avoir d'impact sur leur capacité à présenter l'antigène.

#### 4) Conclusion Générale

En conclusion, nous avons montré que les sérums de souris soumises à un stress hypergravitaire aigu ou chronique entraînent une diminution de l'expression des marqueurs d'activation/maturation des DC spléniques. L'apparition de ce phénotype plus immature n'étant pas observée concernant les sérums provenant de souris soumises à un stress de type socio-environnemental, ceci illustre les différences qui peuvent exister selon les types de stress étudiés (socio-environnementaux vs mécaniques). Ainsi, nous avons montré que les DC spléniques sont sensibles à des facteurs plasmatiques, encore non identifiés, présents dans les sérums de souris ayant subi un stress de type gravitaire.

Concernant l'exposition directe de DC spléniques et de BMDC à la microgravité simulée par RPM, nous avons pu mettre en évidence i) une diminution de la polymérisation du cytosquelette d'actine, ii) une augmentation de l'apoptose et iii) une diminution de l'expression membranaire des marqueurs d'activation/maturation pouvant être expliquée par une diminution de leurs transcrits. Concernant ce dernier point, il est donc intéressant de noter les effets similaires de l'exposition à la microgravité simulée et à des sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire sur le phénotype d'activation/maturation des DC. Lorsque les DC spléniques et les BMDC sont activées/maturées au LPS durant leur exposition à la microgravité simulée, les effets observés vont différer selon le type de DC étudié. En effet, nous avons observé i) une augmentation de la quantité d'actine polymérisée dans les BMDC alors qu'une diminution persiste dans les DC spléniques, ii) un effet protecteur de l'activation/maturation au LPS contre les effets pro-apoptotiques de la RPM et iii) un phénotype immature qui persiste pour les DC spléniques activées contrairement aux BMDC



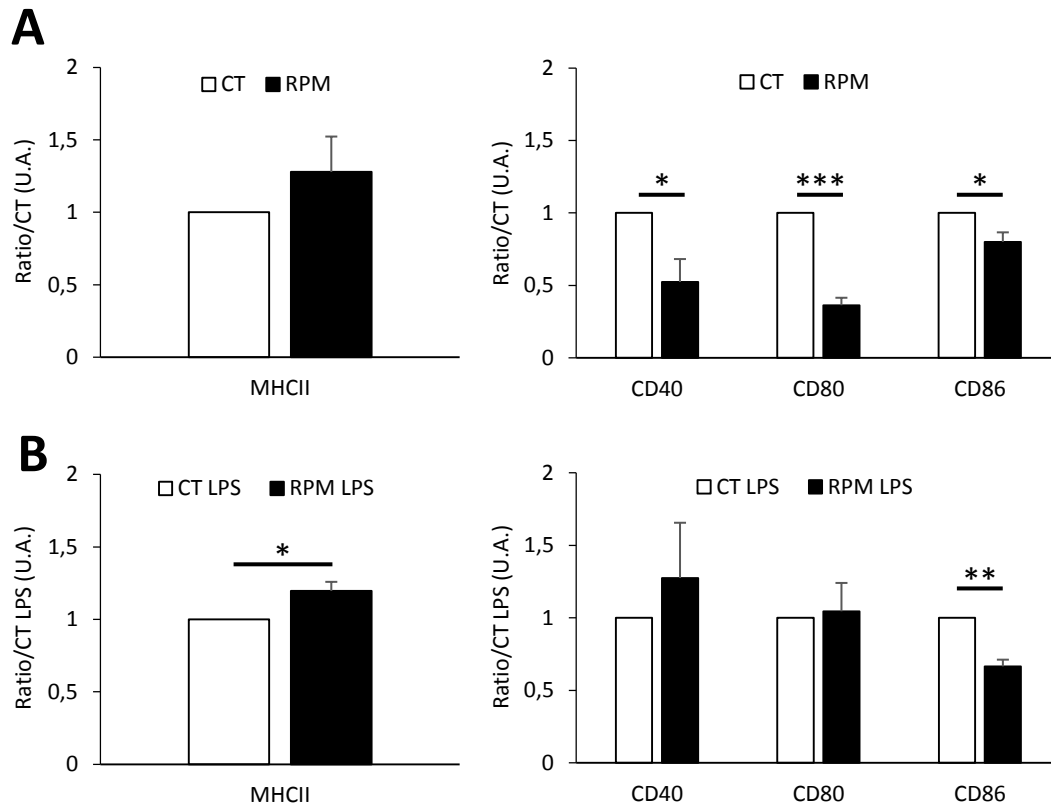
**Figure 30 : La microgravité simulée entraîne une diminution des transcrits des molécules de co-stimulation des BMDC traitées ou non avec du LPS**

Des expériences de RT-qPCR ont été réalisées afin de quantifier les transcrits du CMHII, de CD40, CD80 et CD86 dans des BMDC après 24h de culture en microgravité simulée (RPM) en absence **(A)** ou en présence **(B)** de LPS. N = 3. RPM=Random Positioning Machine; LPS = Lipopolysaccharide. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

avec une absence de corrélation entre variations d'expression des protéines membranaires et de transcrits. Il semblerait par conséquent, qu'au moins en condition d'activation/maturation au LPS, d'autres mécanismes cellulaires soient impactés par la RPM et que ceux-ci participent aux variations d'expression membranaire des marqueurs phénotypiques. Enfin, malgré son impact sur l'expression membranaire des molécules de co-stimulation ainsi que sur le cytosquelette d'actine, il semblerait que le stress microgravitaire n'altère pas la capacité des DC spléniques à présenter l'antigène aux LT CD4<sup>+</sup>.

Néanmoins, il serait également intéressant d'étudier leur capacité à polariser les LT CD4<sup>+</sup> vers des profils pro-inflammatoires (Th1, Th2 ou Th17) ou régulateurs (Treg). En effet, les DC spléniques exposées à la RPM sont caractérisées par un phénotype plus immature puisqu'elles expriment moins de molécules de co-stimulation et sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires. Ce phénotype immature pourrait induire des fonctions tolérogènes. Ainsi leur fonction de polarisation des LT CD4<sup>+</sup> pourrait donc être modulée par le stress microgravitaire.



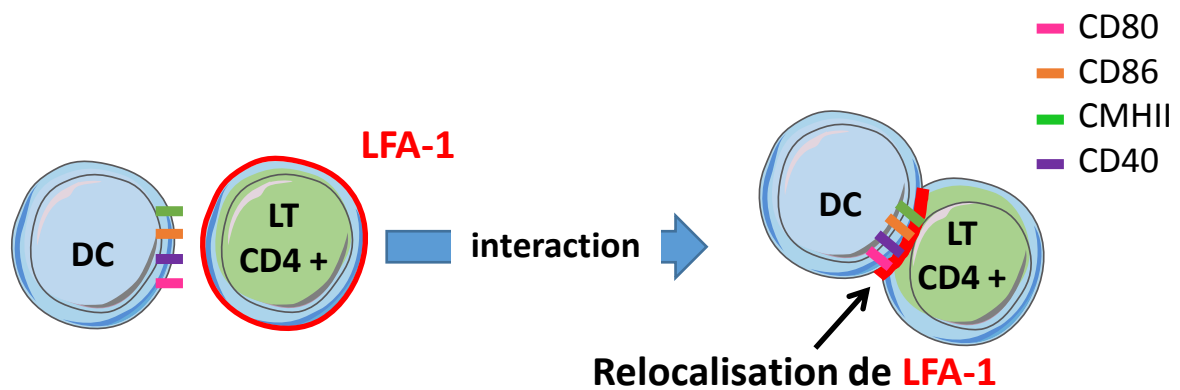


**Figure 31 : La diminution des transcrits des molécules de co-stimulation en condition microgravitaire est partiellement rattrapée lorsque les DC spléniques sont activées**

Des expériences de RT-qPCR ont été réalisées afin de quantifier les transcrits du CMHII, de CD40, CD80 et CD86 dans des DC spléniques cultivées durant 24h en microgravité simulée (RPM) ou non (CT) en absence **(A)** ou en présence **(B)** de LPS. N = 3. RPM=Random Positioning Machine; LPS = Lipopolysaccharide. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

---



**Figure 32 : Présentation de l'Ag par les DC spléniques aux LT CD4<sup>+</sup>**

Les DC spléniques captent, apprêtent l'Ag exogène sur le CMHII et augmentent l'expression membranaire du CMHII chargé et des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86. Le LT CD4<sup>+</sup> exprimant le TCR complémentaire ainsi que LFA-1 va former un conjugué avec la DC présentant l'Ag. Lorsque le contact sera bien établi, il va y avoir formation de la synapse immunologique caractérisée par la relocalisation de LFA-1 au niveau de la zone de contact entre DC et LT.

### **III. Discussion et perspectives**

Le stress, bien que fondamental pour la survie des organismes semble également avoir des effets délétères sur la réponse immunitaire innée et adaptative [239,240,244,431]. Dans ce contexte, les différents types de stress associés aux vols spatiaux ont été montrés comme engendrant des altérations du développement, de la prolifération et de la fonction des cellules du SI [418–420]. Cependant, étant donné le nombre restreint de missions spatiales, il est toutefois nécessaire d'utiliser des modèles permettant de simuler, sur Terre, les stress rencontrés en vol dans le but d'étudier leurs effets. Ainsi, au cours de cette thèse, nous avons étudié les effets de stress associés aux vols spatiaux et simulés en laboratoire sur le système du complément et les cellules dendritiques.

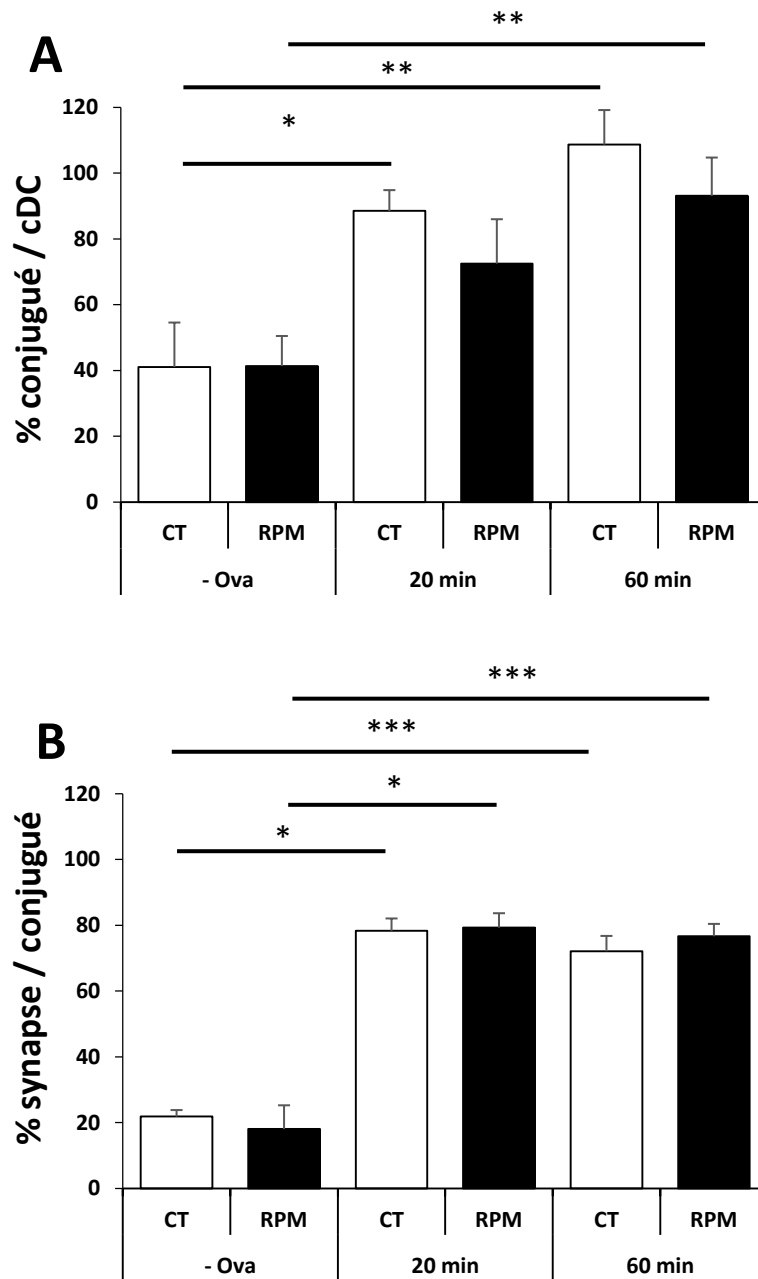
La première partie de ce travail de thèse a consisté à étudier l'effet individuel ou combinatoire de différents types de stress, associés aux vols spatiaux et recréés en laboratoire, sur l'expression de la molécule C3 du complément chez l'amphibien et la souris. Les résultats de ce travail ayant fait l'objet d'une publication, ils ne seront pas discutés ici (**cf. Résultats Partie I.C.**).

La seconde partie de cette thèse concerne l'étude des effets du stress sur les DC. En effet, étant donné leur rôle central dans la réponse immunitaire innée et adaptative, il nous a paru essentiel de mieux comprendre la manière dont le stress est capable de moduler leur phénotype et leur fonction.

#### **A. Etude des effets du stress sur les cellules dendritiques murines.**

##### **1. Effets de différents types de stress sur les DC spléniques**

Nous nous sommes tout d'abord demandé si les DC étaient sensibles à différents types de stress. Pour répondre à cette question, des DC spléniques ont été exposées à des sérums de souris soumises à un stress socio-environnemental (CUMS ; chronique) ou physique (hypergravité ; aigu ou chronique). Nos résultats montrent que le phénotype d'activation/maturation des DC est impacté uniquement lorsqu'elles sont exposées aux sérums de souris ayant subi un stress physique hypergravitaire et ce, qu'il soit aigu ou chronique. Cette altération est caractérisée par une diminution d'expression de l'ensemble des marqueurs étudiés (CMHII, CD40 et CD86). A l'inverse, les sérums issus de souris soumises à un CUMS n'ont pas d'effet sur le phénotype des DC spléniques. De manière plus générale, le stress chronique est pourtant connu pour diminuer les fonctions immunitaires



**Figure 33 : La microgravité simulée ne semble pas altérer la capacité des cDC spléniques à présenter l'Ag**

Les cDC spléniques ont été cultivées en condition de microgravité simulée (RPM) ou non. Après 24h, les expériences de présentation de l'Ag (Ova) ont été réalisées et les LT CD4+ naïfs ont été mis en contact des cDC spléniques (préalablement marquées au CTB et pulsées à l'Ova ou non (-Ova)) durant 20 min ou 60 min. Un marquage immunofluorescent de LFA-1 a ensuite été réalisé. Les graphiques représentent le pourcentage de conjugué/cDC (A) et de synapse/conjugué (B) réalisés en double aveugle. N=3; n= 4 champs/condition et par expérience. RPM=Random Positioning Machine. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

[240] et le CUMS a plus spécifiquement été montré comme pouvant altérer certains compartiments immunitaires comme la répartition de sous-populations de LT [759]. Cette absence d'altération phénotypique des DC exposées aux sérums de souris ayant subi un stress chronique CUMS peut toutefois s'expliquer par les différences d'intensité et de séquences qui peuvent exister entre les différents protocoles de CUMS. En effet, le modèle utilisé au laboratoire n'induit, par exemple, aucune modification de la répartition des LT [342]. Ces différences pourraient être liées au protocole de stress utilisé dans le modèle CUMS engendrant [338,339] ou non [340,341] une élévation du taux de glucocorticoïdes. En effet, la corticostérone, qui est une des principales hormones relarguées par l'axe HHS, est connue pour avoir un effet anti-inflammatoire sur les cellules du SI [760]. Afin d'expliquer nos résultats, nous avons donc dosé la corticostérone sérique par ELISA dans les différents sérums.

De manière intéressante, le niveau de corticostérone est plus élevé uniquement dans les sérums provenant de souris soumises à un stress hypergravitaire aigu. Ainsi, ces résultats permettraient d'expliquer l'absence d'effet des sérums provenant des souris soumises au CUMS sur les DC. De plus, ils nous amènent à penser que la corticostérone ne peut pas être responsable du phénotype plus immature des DC exposées aux sérums de souris soumises à un stress hypergravitaire chronique. Toutefois, sa présence dans les sérums de souris soumises à un stress hypergravitaire aigu pourrait expliquer la plus forte diminution d'expression des marqueurs de maturation/activation par rapport au stress hypergravitaire chronique. Il existerait par conséquent d'autres facteurs sériques capables d'impacter le phénotype d'activation/maturation des DC spléniques. Dans le but de mettre en évidence ces facteurs, nous avons analysé la présence de cytokines dans les sérums. En effet, les cytokines pro-inflammatoires, telles que le  $TNF\alpha$ , l' $IL-1\beta$  et l' $IFN$  de type 1, ainsi que les cytokines anti-inflammatoires, telles que l' $IL-10$  et le  $TGF\beta$ , sont connues pour moduler l'expression des marqueurs étudiés [761–764]. Toutefois, des expériences de cytokines array ont montré que les stress hypergravitaires aigu et chronique ne semblaient pas impacter de manière importante la production de cytokines et nous n'avons pas pu mettre en évidence une variation commune d'une ou plusieurs cytokines. Au vu de ces résultats, il semblerait que le phénotype immature des DC spléniques exposées aux sérums de souris ayant subi un stress hypergravitaire aigu et chronique ne soit dû ni à la corticostérone, ni à une modulation de cytokines pro- ou anti-inflammatoire. Il est cependant à noter que les résultats



préliminaires et semi-quantitatifs de cytokine array devront être confirmés. Enfin, il serait également possible que d'autres cytokines (absentes de la membrane de détection) ainsi que d'autres types de facteurs solubles, jouent un rôle dans l'induction du phénotype plus immature des DC spléniques comme par exemple d'autres hormones de stress non dosées (e.g. catécholamines) [549,765,766]. Pour conclure quant à l'effet des sérums de souris stressées, nous avons pu mettre en évidence que le phénotype des DC semble être sensible au stress hypergravitaire.

## **2. Effets d'un stress microgravitaire sur les DC**

Dans le but d'approfondir les résultats obtenus ci-dessus, nous avons souhaité étudier les effets directs que pouvait avoir un stress de type physique sur les DC en utilisant la RPM qui est un modèle de microgravité simulée. Cette approche, *in vitro*, nous a permis d'étudier les effets directs de la microgravité sur des DC spléniques et différenciées à partir de moelle osseuse, maturées/activées ou non au LPS.

### ***a) Effets de la microgravité simulée sur le cytosquelette et l'apoptose des DC***

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux processus cellulaires connus pour être impactés par la microgravité simulée sur d'autres types cellulaires tels que le cytosquelette d'actine [655,744–746] et l'apoptose [657,674,677]. Nous avons observé une dépolymérisation du cytosquelette d'actine des DC spléniques (tendance) ainsi que des BMDC exposées à la RPM en absence de LPS. En condition activée/maturée au LPS par contre, nous avons observé une divergence entre BMDC et DC spléniques. En effet, nous avons mis en évidence une dépolymérisation du réseau d'actine dans les DC spléniques activées mais pas dans les BMDC activées qui présentent même une augmentation de la polymérisation de l'actine. Ainsi, bien que des différences selon la population de DC aient été observées, nous avons pu montrer que leur cytosquelette est sensible à la RPM et ces résultats sont en accord avec la bibliographie montrant une diminution de la polymérisation du cytosquelette d'actine dans d'autres types cellulaires [655,744–746].

La microgravité simulée a également été montrée comme induisant une augmentation de la mort cellulaire par apoptose dans différents types cellulaires [767–769] comme les lymphocytes T [770]. Nous avons par conséquent souhaité savoir ce qu'il pouvait en être concernant les DC. En accord avec ces résultats, nous avons mis en évidence une diminution de la survie des DC spléniques et des BMDC soumises à la microgravité. Ces résultats sont en





corrélation avec des études montrant une diminution de la viabilité de DC murines cultivées également en condition de microgravité simulée mais à l'aide d'un modèle différent de la RPM : le « Rotating Wall Vessel » (RWV) qui est un clinostat 2D [674,677]. Cependant, cette diminution de viabilité des DC exposées à la RPM n'est visible qu'en condition basale (sans LPS) puisque nous avons observé un retour à la normale en condition activée au LPS. L'activation des DC aurait par conséquent un effet « protecteur » contre les effets pro-apoptotiques de la microgravité simulée comme cela a été montré dans diverses études. En effet, il a été montré que le traitement au LPS de cellules souches mésenchymateuses ainsi que de DC, provoquait l'activation de la voie PI3K impliquée dans la survie cellulaire [771,772]. L'activation au LPS provoque également la survie de cellules de la microglie [773] ou de LT [774]. Cette activation des DC, induite par le LPS, augmenterait leur survie afin de leur permettre de migrer vers les ganglions lymphatiques dans le but de présenter l'Ag aux LT. En effet, des auteurs ont montré que le LPS permettait aux DC de mieux répondre aux signaux provenant des LT [775]. Il est cependant à noter qu'une apoptose importante a été observée au niveau des cultures contrôles à la fois dans les BMDC et les DC spléniques (65% et 60% respectivement). Cela est certainement dû à l'absence d'activation au LPS d'une part et de supplémentation en cytokines d'autre part. En effet, diverses études ont montré une amélioration de la survie des DC en présence de cytokines [776–779] ou après activation [772,780]. De plus, la microgravité simulée par RPM nécessite des conditions particulières telles que la culture cellulaire en puits pleins (afin d'éviter les bulles perturbant la mise en place d'une microgravité simulée) et l'ajout d'une membrane réduisant les échanges gazeux par rapport à une boîte/flasque de culture standard. L'ensemble de ces conditions de culture peut par conséquent participer au pourcentage important d'apoptose dans les conditions contrôles.

Compte tenu de l'importance des contacts cellulaires dans la survie des cellules [751,752], nous nous sommes demandé si l'absence de sédimentation en RPM et la présence d'un culot en condition contrôle pouvait expliquer les variations de survie observées au niveau des DC cultivées en RPM par rapport aux contrôles. Cependant, la mise en place d'un schéma expérimental visant à répondre à cette question posait certains problèmes techniques. En effet, la première idée que nous avons eu pour étudier cette question consistait à placer une plaque en RPM (microgravité) et une seconde sous agitation (normogravité) afin d'empêcher la sédimentation. Cependant, ce plan expérimental n'était pas adapté car les cellules



cultivées dans la plaque sous agitation auraient été soumises à des forces gravitaires (dues aux accélérations et décélérations répétées) ainsi qu'à des forces de cisaillement ne pouvant être prises en compte. Ainsi, nous avons décidé de cultiver des BMDC à différentes concentrations afin d'augmenter les contacts en condition RPM. Nous avons observé que l'augmentation de la concentration n'avait pas d'impact sur l'apoptose des BMDC suggérant ainsi que les effets observés en condition RPM seraient bien dus à la microgravité simulée et non pas à une réduction des contacts intercellulaires.

### ***b) Impact du stress microgravitaire sur le phénotype d'activation/ maturation des DC***

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de la RPM sur le phénotype d'activation/maturation des DC. En effet, nous avons montré une altération de ce dernier en réponse à un stress hypergravitaire mais de manière indirecte *via* l'exposition de DC à des sérums de souris ayant subi ce stress. Concernant la microgravité simulée par RPM, nous avons montré que les BMDC exposées présentent un phénotype plus immature par rapport aux BMDC contrôles et que la RPM impacte les BMcDC et non pas les BMpDC. De plus, nous avons pu voir que les BMDC étaient capables de maturer/s'activer normalement en présence de LPS.

Nous avons ensuite souhaité étudier les effets de la microgravité simulée par RPM sur les cDC spléniques caractérisées par un phénotype basal plus mature que les BMDC et pouvant également être activées au LPS. Nous avons observé que l'expression membranaire du CMHII n'était pas altérée mais qu'il y avait diminution de l'ensemble des molécules de co-stimulation. Ces dernières étaient également diminuées à la surface des cDC spléniques activées au LPS. Ainsi, la microgravité simulée par RPM engendre un phénotype plus immature des BMcDC et des cDC spléniques dans les cellules non activées avec du LPS. Ces résultats sont en accord avec une étude ayant montré que le phénotype des DC était affecté par la microgravité simulée [673] et suggèrent qu'il pourrait y avoir altération de l'efficacité de réponse aux pathogènes comme cela a été montré chez la souris [674]. Cependant, seuls les marqueurs phénotypiques HLA-DR (= CMHII) et CD80 ont été pris en compte dans ces expériences relativement anciennes où les auteurs ont utilisés d'autres modèles de DC (humaines vs murines) et de simulation de la microgravité (Rotary Cell Culture System (RCCS) vs RPM). A noter qu'un lien entre les altérations de cytosquelette (présentées ci-dessus) et d'expression des marqueurs d'activation/maturation pourrait exister puisqu'il a été montré



qu'une induction chimique de la dépolymérisation du cytosquelette d'actine empêche la maturation de BMDC [781].

A l'état activé/maturé au LPS par contre, nous observons un retour à la normale du phénotype des BMDC alors que celui des cDC spléniques reste plus immature en RPM par rapport aux cellules contrôles. Une différence majeure entre ces deux types de DC est leur état basal d'expression des marqueurs étudiés. En effet, les BMDC sont très immatures tandis que les DC spléniques expriment de manière plus importante les marqueurs phénotypiques étudiés. Ainsi, il se pourrait que lors de l'activation au LPS des BMDC, il y ait production tellement importante des marqueurs que l'effet de la RPM ne soit plus visible. En effet, il a été montré que le LPS provoquait une synthèse protéique rapide et importante dans les DC et notamment des marqueurs d'activation/maturation étudiés ici [772]. Sachant que le LPS est ajouté en début de RPM, il est par conséquent possible que ce dernier engendre une augmentation des marqueurs avant que les effets de la microgravité simulée ne puissent se mettre en place. Il se peut également que les voies de signalisation activées par le LPS soient les mêmes que celles impactées par la RPM annulant ainsi son effet. Concernant la signalisation mise en place lors de l'activation au LPS, il serait également possible qu'elle diffère entre BMDC et cDC spléniques. En effet, il a été montré que la microgravité impactait l'activation au LPS de monocytes passant par JNK (Jun-N-terminal kinase) et non pas par p38 [656]. Ainsi, si les BMDC et DC spléniques diffèrent au niveau de leur programme de signalisation cellulaire, cela pourrait participer aux différences de résultats obtenus lorsque ces deux types cellulaires sont activés en microgravité. Il est également connu que de nombreuses régulations cytokiniques découlent de l'activation du TLR4 comme par exemple une augmentation de l'IL-6 qui va entraîner la diminution de la production d'IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-8 (CXCL8) [782]. Ainsi, si la sensibilité ou la capacité des BMDC et des DC spléniques à sécréter des cytokines varie, cela pourrait expliquer les différences de phénotype observées au niveau membranaire. Enfin, il serait également possible que l'expression de certaines molécules associées au transport des marqueurs diffère entre BMDC et DC spléniques ce qui pourrait expliquer les différences de réponse au niveau de la condition RPM + LPS. En effet, des molécules telles que MARCH1, régulant le transport des marqueurs phénotypiques et donc leur expression à la membrane [783,784], pourraient être différenciellement exprimées au sein des BMDC et des DC spléniques.



Nous avons ensuite réalisé des expériences préliminaires de cytokine array sur les surnageants des cDC spléniques exposées à la RPM et avons montré une baisse de trois cytokines pro-inflammatoires que sont IP-10, MCP-1 et IL-6 ce qui pourrait participer à leur phénotype plus immature. Plusieurs études ont montré un lien entre phénotype immature des DC et diminution de leur production de cytokines pro-inflammatoires [785–787] ce qui est en accord avec nos résultats. Concernant l'IL-6, les résultats que nous avons obtenus peuvent être mis en parallèle d'une étude montrant également une diminution de la production d'IL-6 en vol par des ostéoblastes. Il faut cependant garder à l'esprit que cette étude porte sur les variations de transcrits en vol contrairement aux protéines sécrétées dans les surnageant en RPM dans notre cas [788]. A noter que l'IL-6 à l'état basal aurait plutôt une action suppressive sur la fonction des DC puisque des souris *Il6*<sup>-/-</sup> présentent des DC exprimant très fortement le CMHII et CD86 [184]. Une autre étude portant sur des monocytes cultivés en condition de vol parabolique a montré que ces derniers présentent un phénotype plus inflammatoire (contrairement aux DC en RPM dans nos études) mais que, parallèlement, ils produisent plus de cytokines anti-inflammatoires. D'après les auteurs, cela consisterait en une contrebalance entre phénotype et production cytokinique. Dans tous les cas, cette étude montre un impact clair des variations de gravité (alternance microgravité et hypergravité) à la fois sur le phénotype et la production de cytokines [789]. Elle est par conséquent en accord avec les différents résultats que nous avons obtenus au niveau de l'exposition à des sérums et à la microgravité.

Il existe de nombreuses étapes avant d'arriver à l'expression des marqueurs d'activation/maturation à la membrane et la microgravité est susceptible de les impacter ou d'altérer leurs mécanismes de régulation (e.g. accessibilité de l'ADNg et transcription [790–792]; traduction [793,794]; transport à la membrane influencé par le cytosquelette [655,743–747]). Nous nous sommes déjà intéressés plus haut à l'impact de la RPM sur le cytosquelette d'actine des DC. Afin d'expliquer tout ou partie des altérations d'expression membranaire des marqueurs d'activation/maturation, nous avons par conséquent souhaité étudier l'influence de la microgravité simulée sur leur quantité de transcrits dans les DC spléniques et les BMDC activées ou non au LPS. Nous avons observé une diminution de la quantité de transcrits de l'ensemble des marqueurs phénotypiques des BMDC et de l'ensemble des molécules de co-stimulation des cDC spléniques pouvant ainsi expliquer les variations phénotypiques observées en cytométrie en flux. En présence de LPS par contre,





nous avons mis en évidence une absence de corrélation entre variations de transcrits et variations d'expression des marqueurs à la surface des DC spléniques et des BMDC. Concernant les BMDC, ces discordances de résultats pourraient provenir du fait que 30% des cellules à partir desquelles l'ARN a été obtenu correspondent à des BMpDC (non impactées au niveau membranaires) contrairement aux résultats FACS qui sont observés dans des populations spécifiques. Les différences observées entre BMDC et cDC spléniques au niveau transcriptionnel pourraient également provenir du fait que les BMDC aient été différenciées *in vitro* et que, par conséquent, leur phénotype basal soit différent de celui des DC spléniques ayant été en contact avec l'environnement cellulaire complexe de la rate. Ces dernières pourraient ainsi être plus promptes à répondre à des signaux d'activation. De plus, une diminution du taux de transcrit ne peut pas forcément être directement liée à une diminution de leur transcription. En effet, d'autres facteurs tels que la demi-vie des ARNm ou encore l'accessibilité de l'ADN peuvent être impactés comme cela a été montré à la fois en suspension anti-orthostatique [795] ou sur des cellules cultivées en clinostat [427] dont des cellules du SI tels que des lymphocytes [791,792]. Il est également possible d'imaginer que des molécules impliquées dans la transcription ou dans sa régulation pourraient être impactées par la microgravité et participer à la diminution de la quantité de transcrits (e.g. régulation promoteur, recrutement complexe polymérase, facteurs de transcription diminués etc...). Pour conclure, de nombreux mécanismes (non étudiés jusqu'ici) pourraient être impactés par la RPM et expliquer à la fois les différences de résultats obtenus entre BMDC et DC spléniques ainsi qu'entre ARNm et cytométrie en flux en condition LPS.

### ***c) Effet du stress microgravitaire sur la fonction de présentation antigénique des DC spléniques***

Pour finir, nous avons voulu savoir si les altérations phénotypiques observées en RPM, à la fois au niveau de l'expression des marqueurs membranaires et de la production cytokinique, pouvaient impacter la fonction de présentation antigénique des DC spléniques. Nos résultats ont montré que les DC spléniques cultivées en microgravité simulée semblaient tout aussi capables de former des conjugués et des synapses immunologiques avec les LT CD4<sup>+</sup> naïfs par rapport aux DC contrôles. Ainsi, malgré leur phénotype plus immature, il semblerait que les DC spléniques exposées à la RPM soient capables de réaliser la présentation antigénique. Cependant, il est possible que la fonction de présentation de l'Ag soit tout de même affectée *in vivo* en condition microgravitaire puisque les Ag captés sont souvent sous forme protéique



et non pas peptidique (Ova) comme dans notre étude. En effet, la présentation de l'Ag par les DC est plus efficace si ce dernier provient d'un peptide plutôt que d'une protéine [796]. De plus, la microgravité a déjà été montrée comme impactant la capacité de phagocytose des DC [673]. Ainsi, il est possible d'imaginer que le mécanisme d'apprêtement de l'Ag soit également altéré par la RPM et que, par conséquent, la microgravité simulée perturbe tout de même la présentation de l'Ag. Un défaut de présentation viendrait s'ajouter au fait qu'une exposition prolongée des LT à la microgravité empêche leur activation par les DC [797].

Enfin, malgré une fonction de présentation inaltérée, des différences au niveau de la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> par les DC soumises à la microgravité pourraient être attendues. En effet, nous avons montré que la RPM impacte les DC notamment au niveau du cytosquelette ainsi que de l'expression des molécules de co-stimulation et de certaines cytokines (résultats à confirmer). De plus, il est également probable que la microgravité impacte les voies de signalisation permettant l'activation et le bon fonctionnement des DC, comme cela a été montré dans de nombreux types cellulaires dont les LT [670]. La signalisation cellulaire [798] ainsi que la production cytokinique (**cf. Introduction partie I.C.2.f.ii.**) sont importantes pour la fonction de polarisation des LT. De plus, l'état d'activation/maturation des DC peut être relié à l'induction de profils de LT tolérogènes [799,800]. Ainsi, ayant observé une induction de DC immatures par la RPM, l'étude de la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs par des DC exposées à la microgravité simulée nous semble par conséquent indispensable.

De manière intéressante, une étude menée en condition de vol spatial a montré une perturbation de l'induction de la tolérance vis-à-vis d'un antigène spécifique *in vivo* et une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires [676]. Cette expérience d'immunisation en vol montre par conséquent l'inverse de ce à quoi nous pourrions nous attendre au vu de nos résultats obtenus en condition de microgravité simulée où les DC présentent un phénotype plus immature. Néanmoins, il existe de nombreux autres paramètres à prendre en compte en condition de vol réel et *in vivo* par rapport aux conditions de microgravité simulée *in vitro*. En effet, les radiations ainsi que l'environnement cellulaire pourraient avoir un impact majeur sur les résultats de l'étude. Il se pourrait également que l'immaturité des DC, observée dans notre étude, ne soit qu'un stade transitoire susceptible d'être suivi d'un retour à la normale. De plus, les mécanismes permettant aux cellules de détecter les changements de gravité n'ont pas encore été



élucidés et il est par conséquent possible qu'elles soient plus sensibles au changement d'environnement cellulaire d'un point de vue mécanique plutôt qu'à l'absence de force gravitaire ressentie [801] expliquant ainsi les divergences *in vivo*. Enfin, bien que la RPM entraîne des effets identiques à ceux observés en vol, ceux-ci semblent être néanmoins de moins grande amplitude. Cela est peut être dû au fait que la microgravité met plus de temps à se mettre en place lorsqu'elle est simulée par la RPM alors qu'elle est directement présente en vol. Les mécanismes exacts par lesquels la microgravité influence les cellules n'étant pas encore définis [802], il se pourrait par conséquent que les effets intermédiaires de la RPM (entre ceux des contrôles à 1g et ceux en vol) soient dus à une variation de cinétique quant à la simulation de la microgravité. Ainsi, il était important de procéder à une approche *in vitro* afin de s'intéresser à l'impact direct d'un stress précis. Toutefois, il serait intéressant d'étudier *in vivo* le phénotype d'activation/maturation des DC spléniques de souris soumises d'une part, à une hypergravité (aigüe et chronique) par centrifugation et d'autre part, à une microgravité simulée (HU) ou réelle (vol spatial) afin de comparer les résultats à ceux que nous avons obtenus au niveau de l'étude des sérums et en condition RPM respectivement.

Pour conclure, nos résultats montrent un impact important de la microgravité simulée sur le cytosquelette et la survie des DC ainsi que l'induction d'un phénotype plus immature de ces dernières. La microgravité constitue de ce fait un stress majeur rencontré durant les vols spatiaux et il est probable qu'elle soit également en mesure d'impacter la fonction de polarisation des LT CD4<sup>+</sup>. Si tel est le cas, la microgravité pourrait donc présenter un danger vis-à-vis du maintien des capacités de défense du SI face aux pathogènes en vol.



## **ANNEXES**

---





**Publication:** Modulation of Iberian Ribbed Newt Complement Component C3 by Stressors Similar to those Encountered during a Stay Onboard the International Space Station.

---

Guéguinou N, Jeandel J, Kaminski S, Baatout S, Ghislin S, Fripiat JP.


**ANNEXE 1**





Article

# Modulation of Iberian Ribbed Newt Complement Component C3 by Stressors Similar to those Encountered during a Stay Onboard the International Space Station

Nathan Guéguinou <sup>1,†</sup>, Jérémy Jeandel <sup>1,†</sup>, Sandra Kaminski <sup>1</sup>, Sarah Baatout <sup>2</sup>,  
Stéphanie Ghislin <sup>1</sup> and Jean-Pol Frippiat <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Stress Immunity Pathogens Laboratory, EA 7300, Faculty of Medicine, Université de Lorraine, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France; nathan.gueguinou@laposte.net (N.G.); jeremy.jeandel@univ-lorraine.fr (J.J.); sandra.kaminski@univ-lorraine.fr (S.K.); stephanie.ghislin@univ-lorraine.fr (S.G.)

<sup>2</sup> Radiobiology Unit, SCK-CEN, Boeretang 200, B-2400 Mol, Belgium; sarah.baatout@sckcen.be

\* Correspondence: jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-372746286

† These authors contributed equally to this manuscript.

Received: 6 February 2019; Accepted: 27 March 2019; Published: 29 March 2019



**Abstract:** The complement system plays an important role in inflammation, innate and acquired immunity, as well as homeostasis. Despite these functions, the effects of spaceflight conditions on the complement system have not yet been intensively studied. Consequently, we investigated the effects of five types of chronic stressors, similar to those encountered during a stay onboard the International Space Station, on C3 expression in larvae of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. We focused on C3 because it is a critical component of this system. These studies were completed by the analysis of adult mice exposed to two models of in-flight stressors. Our data show that simulating space radiation, or combining a modification of the circadian rhythm with simulated microgravity, affects the amount of C3 proteins. These results suggest that C3 expression could be modified under real spaceflight conditions, potentially increasing the risk of inflammation and associated tissue damage.

**Keywords:** spaceflight; gravity; amphibian; immunity; inflammation

## 1. Introduction

Since Yuri Gagarin became the first human to leave the confines of Earth in 1961, an increasing number of humans have traveled to space and permanently inhabited space stations (Mir and then the International Space Station (ISS)) have been constructed. Studies performed on humans or animals sent to these stations, or subjected to ground-based models used to simulate space conditions, have revealed that these missions induce physiological dysregulations such as muscle atrophy, bone demineralization, cardiovascular and metabolic dysfunctions, impaired cognitive processes, and reduced immunological competence.

Immune system dysregulation occurs during flight and persists during 6-month orbital spaceflight [1,2]. A recent study revealed that about 50% of the astronauts who spent six months onboard the ISS faced immunological problems [3], thereby confirming in-flight dysregulation distinct from the influences of landing and readaptation following deconditioning [1,3,4]. All compartments of the immune system are affected by spaceflight. Concerning innate immunity, it was shown that astronauts' monocytes exhibit phenotypic and cytokine-production deregulations and a reduced

ability to engulf *E. coli*, to elicit an oxidative burst, and to degranulate [5–7]. Reactive oxygen species production by macrophages [8] as well as neutrophils phagocytosis and oxidative burst capacities are also significantly reduced [9]. Regarding acquired immunity, several studies reported a reduction of T-cell activation under low gravity conditions [10–12]. This phenomenon results from changes in gene expression, cellular interactions, cytoskeleton structure, signal transduction, and disturbed expression of cell cycle regulatory proteins (reviewed in [13,14]). As to humoral immunity, it was shown using the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* as animal model [15] that spaceflight affects antibody production in response to an antigenic stimulation [16–18]. This was recently confirmed in mice subjected to hindlimb unloading, a model frequently used to simulate the effects of microgravity exposure [19]. Hypergravity and simulated microgravity also impaired the proliferative responses of murine B-lymphocytes [20,21]. Finally, the maturation of immune cells belonging to the myeloid [22–26], B- [27–29], and T- [30–32] lineages were shown to be reduced under low gravity conditions.

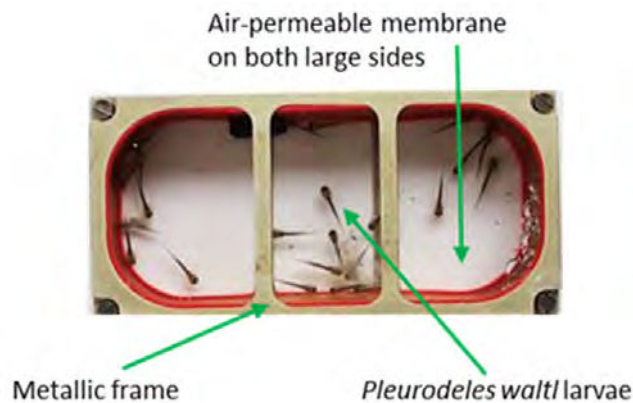
It therefore appears that immunological changes induced by space, an adverse environment in which human and animals face a combination of stressors (e.g., radiation, microgravity, confinement, isolation, and disrupted circadian rhythm), must be seriously investigated and understood to be able to preserve astronauts' health during future deep-space exploration missions such as the deployment of a Lunar station followed by multiple Mars flyby missions.

In this context, the effects of spaceflight conditions on the complement system, which is key for immune surveillance and homeostasis, need to be studied. Complement constitutes a first line of defense against microbial intruders and orchestrates immunological and inflammatory processes [33]. Indeed, opsonization by complement fragments and pro-inflammatory signaling by anaphylatoxins (resulting from complement activation) recruits macrophages and enables phagocytosis and the formation of a lytic membrane attack complex on cells such as gram-negative bacteria. Complement coordinates innate immunity in cooperation with Toll-like receptors (TLR) [34], links innate response to both humoral and cellular adaptive immunity [35], and regulates the mobilization of hematopoietic stem-progenitor cells from bone marrow to replenish the immune system [36]. It also contributes to the resolution of inflammation by promoting the safe clearance of apoptotic cells and immune complexes [37,38]. Moreover, it participates in homeostasis by promoting tissue repair [39,40], potentiating coagulation to limit the spread of infection [41]; it is also implicated in synaptogenesis (it eliminates weak or immature synapses) [42] and in the differentiation and migration of neural progenitor cells [43]. Finally, it is established that any trigger that tips the delicate balance between complement activation and regulation can induce self-attack and lead to various immune, inflammatory, neurodegenerative, ischemic, and age-related diseases [33].

Given this functional repertoire, and a recent study having shown that hypergravity (an acute stressor faced during takeoff and landing) increases in a g-dependent manner C3 complement component expression [29], we investigated whether chronic stressors encountered during a space mission could affect the expression of this molecule conserved from amphibians to mammals [44,45]. We focused on C3 because it is the most abundant complement protein and all complement activation pathways (extracellularly through the classical, lectins, or alternative pathways or intracellularly via a cathepsin-dependent mechanism) converge at the level of this component [46].

## 2. Results

Different groups of *P. waltl* larvae at the same developmental stage were subjected, in parallel, to various environmental modifications similar to those encountered during a mission onboard the ISS or some combination thereof. These stressors were recreated in the laboratory to the best of our technical abilities and were applied for a maximum of 10 days. Experiments were performed on larvae, and not adults, because many of them can be accommodated in small aquaria (miniaquaria—Figure 1) conceived to allow amphibian embryo development onboard the ISS.



**Figure 1.** Miniaquarium developed by EADS (European aeronautic defense and space company)-Astrium and the German Space Agency to allow amphibian embryo development onboard the international space station (ISS). These miniaquaria measure 80 mm in length by 40 mm in width and 20 mm in height, and have two transparent sides that are permeable to O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. Once in the ISS, these miniaquaria are placed in the Kubik incubator to maintain temperature at 20 °C.

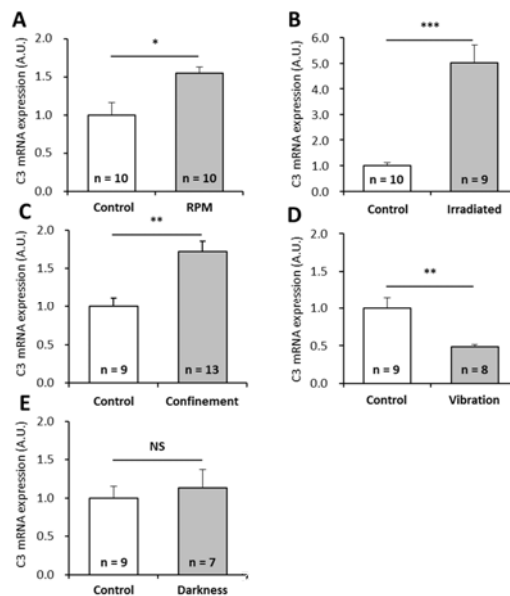
### 2.1. Effects of Simulated Microgravity, Circadian Rhythm Modification, Confinement, Vibration, and Radiation on *P. waltl* C3 Transcription

To determine how these five individual stressors affect C3 transcription, *P. waltl* larvae were exposed to simulated microgravity or darkness during 10 days, confinement, vibration, or a simulation of space radiation. The total dose of radiation mimicked the one received during a 10-day-stay in the Columbus Laboratory of the ISS [47,48], because miniaquaria were developed to fit within the Kubik incubator located in that part of the ISS. Then, C3 transcripts were quantified by RT-qPCR.

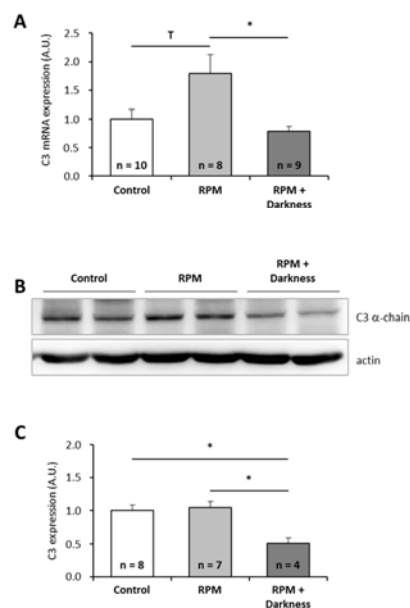
Our results show that the amount of C3 mRNAs is 1.5 times higher in larvae exposed to simulated microgravity (10<sup>-2</sup> to 10<sup>-3</sup> g) using a random positioning machine (RPM) (Figure 2A), 5 times higher in larvae subjected to the ISS radiation environment (Figure 2B), 1.7 times higher in larvae subjected to confinement (Figure 2C), and 0.5 times lower in larvae subjected to vibration (Figure 2D). The perturbation of the circadian rhythm (darkness as miniaquaria are in the dark within the Kubik incubator) did not affect the amount of C3 mRNAs (Figure 2E). Taken together, these results indicate that C3 expression is impacted at the transcriptional level by numerous spaceflight-associated stressors.

### 2.2. Effects of Two Combinations of Stressors on *P. waltl* C3 Expression

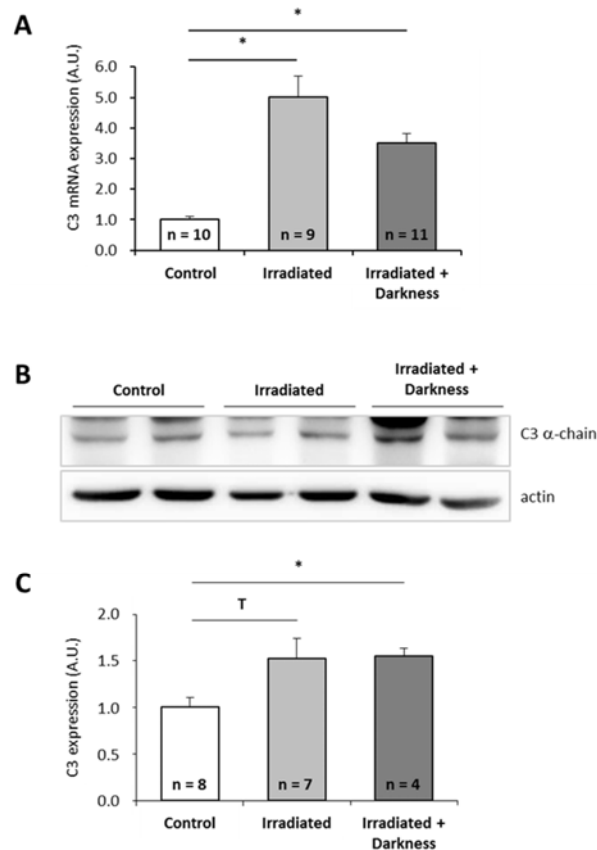
Since astronauts are submitted to a combination of stressors during spaceflight, and not to single stressors as tested above, we wondered how combinations of individual stressors would affect C3 expression. Because it is technically impossible to test all possible combinations, we focused on two combinations of stressors that could be simulated in the laboratory: the combination of simulated microgravity with darkness (Figure 3) and the combination of space radiation with darkness (Figure 4). Interestingly, exposure of larvae to simulated microgravity and darkness did not affect C3 mRNA level (Figure 3A). Thus, it appears that combining simulated microgravity with darkness annuls the effect of microgravity on C3 mRNA expression. However, the amount of C3 proteins was decreased by a factor of two by comparison to controls (Figure 3B,C). Exposure of larvae to simulated space radiation and darkness led to a 3.5-fold increase of C3 mRNA level (Figure 4A) and a 1.5-fold increase of C3 proteins (Figure 4B,C) in comparison to controls. Combining darkness with space radiation did not statistically change the amount of C3 mRNAs and proteins when compared to space radiation alone.



**Figure 2.** Effects of individual stressors, similar to those encountered during a stay in the ISS, on *P. waltl* complement C3 mRNA levels. Complement C3 mRNAs were quantified by RT-qPCR in larvae subjected to (A) simulated microgravity, (B) simulated ISS radiation environment, (C) confinement, (D) vibration, or (E) obscurity. Relative values obtained with unstressed controls were set to 1. Results are expressed as means  $\pm$  SEM. “A.U.” stands for “arbitrary units”. Differences were found using Student’s *t*-tests or Mann–Whitney tests. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , NS., no statistical difference.



**Figure 3.** Effects of the combination of simulated microgravity and darkness on *P. waltl* complement C3 expression. (A) C3 mRNA were quantified by RT-qPCR. (B, C) C3 proteins were quantified by western blotting. Western blot results were visualized by chemiluminescence, analyzed by densitometry, and normalized to  $\alpha$ -actin. Relative values obtained with control larvae placed in a miniaquarium positioned on the base of the random positioning machine (RPM) and subjected to normal light conditions were set to one in (A) and (C). Results are expressed as means  $\pm$  SEM. “A.U.” stands for “arbitrary units”. Differences were found using Kruskal–Wallis followed by a Dunn test (A) or ANOVA followed by a Tukey–Kramer test (C). \*  $p < 0.05$ , T indicates a tendency (statistically significant difference with a 10% alpha risk but not with a 5% alpha risk), NS., no statistical difference.

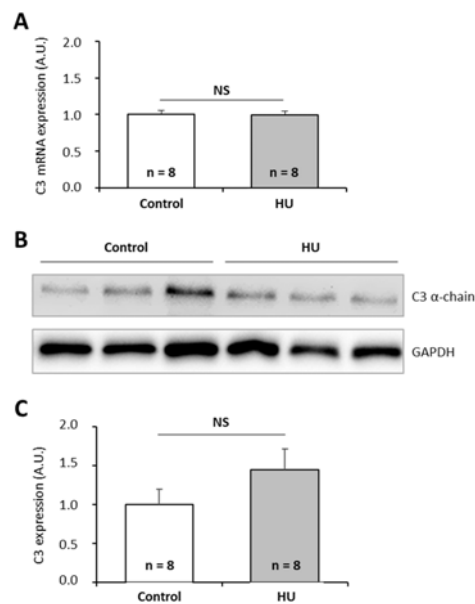


**Figure 4.** Effects of the combination of radiation and darkness on *P. waltl* complement C3 expression. (A) C3 mRNA were quantified by RT-qPCR. (B, C) C3 proteins were quantified by western blotting. Western blot results were visualized by chemiluminescence, analyzed by densitometry and normalized to  $\alpha$ -actin. Relative values obtained with control larvae reared in a nonirradiated miniaquarium subjected to normal light conditions were set to one in (A) and (C). Results are expressed as means  $\pm$  SEM. “A.U.” stands for “arbitrary units”. Differences were found using Kruskal–Wallis followed by a Dunn test. \*  $p < 0.05$ , T indicates a tendency (statistically significant difference with a 10% alpha risk but not with a 5% alpha risk), NS., no statistical difference.

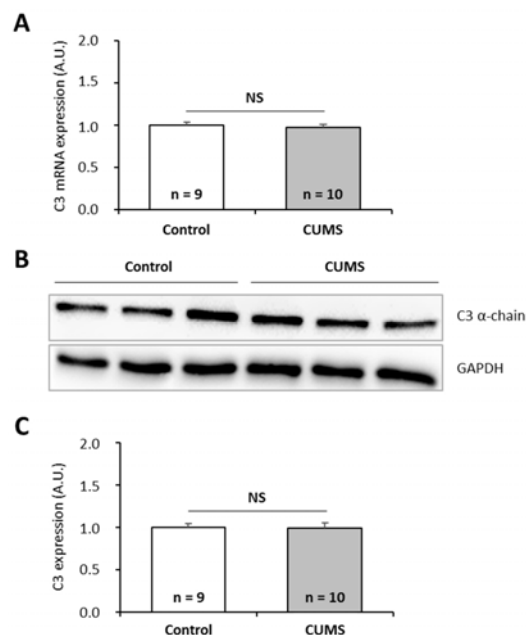
### 2.3. Effects of Spaceflight Stressors on Murine C3 Expression

To further investigate the effects of chronic spaceflight-associated stressors, we exposed mice to hindlimb unloading (HU) used to simulate microgravity [49] or to the CUMS model used to simulate socio-environmental stressors encountered during a stay in a space station [50]. CUMS implies submitting mice to confinement, isolation, disrupted circadian rhythm, interpersonal issues, perturbation of spatial references, lower dietary intake, and uncomfortable living conditions in a chronic and unpredictable manner. This model replicates some spaceflight-induced immunological changes [50]. Then, we quantified C3 mRNAs and proteins in the liver of these animals because this tissue is the major source of complement. Our data show that HU and CUMS exposures did not affect the expression of C3 at the mRNA and protein levels (Figures 5 and 6), indicating that simulations of chronic socio-environmental stressors or of microgravity did not affect C3 expression. This last observation is in agreement with the fact that RPM exposure did not modify the amount of *P. waltl* C3 proteins (Figure 3C).





**Figure 5.** Effects of the hindlimb unloading model, used to simulate microgravity, on murine complement C3 expression. (A) C3 mRNAs were quantified by RT-qPCR. (B, C) C3 proteins were quantified by western blotting. Western blot results were visualized by chemiluminescence, analyzed by densitometry, and normalized to GAPDH. Relative values obtained with control mice reared under normal housing conditions were set to one in (A) and (C). Results are expressed as means  $\pm$  SEM. “A.U.” stands for “arbitrary units”. No differences were found using student’s *t*-tests. NS, no statistical difference.



**Figure 6.** Effects of the CUMS (Chronic Unpredictable Mild psychosocial and environmental Stressors) model, used to simulate socio-environmental stressors encountered during a stay in a space station, on murine complement C3 expression. (A) C3 mRNAs were quantified by RT-qPCR. (B, C) C3 proteins were quantified by western blotting. Western blot results were visualized by chemiluminescence, analyzed by densitometry, and normalized to GAPDH. Relative values obtained with control mice reared under normal housing conditions were set to one in (A) and (C). Results are expressed as means  $\pm$  SEM. “A.U.” stands for “arbitrary units”. No differences were found using student’s *t*-tests. NS, no statistical difference.

### 3. Discussion

During spaceflight, humans and animals are subjected to various environmental modifications. In this study, *P. waltl* larvae were exposed to chronic stressors similar to those encountered during a stay in the ISS (microgravity, perturbed circadian rhythm, radiation, confinement, and vibration) to determine how these individual stressors, but also two combinations of them, affect the expression of a critical component of the complement system. *P. waltl* larvae were used as model organisms because (i) they fulfill many technical requirements associated with spaceflight experimentation; (ii) a hardware has been developed to allow amphibian development onboard the ISS; (iii) this model was shown to be useful for improving our understanding of the immunosuppressive effects of spaceflight [15] and (iv) the cardinal elements of its immune system are conserved [51–53], including C3. These studies were completed by the analysis of mice exposed to two models of inflight stressors.

We noted that, in complement of a previous study having shown that hypergravity exposure increases murine C3 protein expression [29], simulating space radiation or combining simulated microgravity with darkness affects the amount of *P. waltl* C3 proteins, thereby suggesting that C3 expression could be modified under real spaceflight conditions. Indeed, it is known that the complement system is sensitive to disturbances of homeostasis or assault [54]. Furthermore, as reported here, previous studies showed (i) that radiotherapy upregulates human and murine C3 at mRNA and protein levels [55], (ii) that head-down tilt bed, used to simulate weightlessness, does not change human plasma complement factor C3 concentration [56], and (iii) that sleep deprivation does not affect circadian fluctuation of human C3 and C4 plasma concentrations [57].

Changes of C3 mRNA and protein levels could be mounted by *P. waltl* larvae to neutralize harmful free radicals induced by stressors. Indeed, previous studies have shown that spaceflight can cause oxidative damage and the generation of reactive oxygen species (ROS) in humans, rodents, and amphibians [58–61], and that complement plays an important role in the inflammatory process after oxidative stress [62]. Furthermore, there is evidence that ROS activate the complement system and that C3 provides protection against oxidative stress [62–64]. These data might explain why Baqai and colleagues noted that exposure to the spaceflight environment increases murine anti-inflammatory mechanisms [65]. Another possibility is that danger signals, such as heat shock proteins (a hallmark of stressed cells and organisms is the increased synthesis of HSPs), whose expression is affected by spaceflight [66], regulate C3 expression, as shown, for example, in photodynamic therapy-treated tumors [67]. This hypothesis is supported by the presence of heat shock binding sites in human, mouse, and rat C3 promoters [45]. Given the conservation of C3 across vertebrates, it is very likely that the promoter of the *P. waltl* C3 gene also contains such binding sites.

Changes in C3 expression could be involved in numerous spaceflight-associated physiological changes because, besides its obvious involvement in eliminating microbes, complement participates in such diverse processes as synapse maturation, clearance of immune complexes, angiogenesis, mobilization of hematopoietic stem-progenitor cells, tissue regeneration, and lipid metabolism [33]. Furthermore, this system is required at early stage of animal development, for example, at *P. waltl* [45] and *X. laevis* [68] neurulation stages but also for the proper migration of neural crest cells during early vertebrate development [69].

In the future, it will be interesting to quantify complement activation products, because numerous factors can induce the production of these molecules. Indeed, in addition to pathway-dependent activations, coagulation factors such as thrombin, plasmin, FXa (factor Xa), and FXIa (factor XIa) have been shown to induce the cleavage of C3 and C5 proteins promoting the generation of C3a and C5a fragments [70]. Furthermore, radiation upregulate C3a and C5a production [55] and modified membranes of late apoptotic and necrotic cells are potent activators of complement [33]. Thus, changes in coagulation cascade protein expression noted during and after spaceflight [29,71,72], space radiation, and apoptosis, which is frequently increased in microgravity [73–76], could increase the production of C3a and C5a. Since these molecules have pro-inflammatory properties and increase the expression of MHC (major histocompatibility complex) class II and costimulatory molecules on antigen presenting

cells such as dendritic cells, they could influence T cell activation and polarization towards a tolerogenic or inflammatory profile [77,78]. In support of this hypothesis, a recent *in vivo* study in which OT-II cells (CD4<sup>+</sup> T cells expressing a transgenic TCR specifically recognizing chicken ovalbumin) were transferred into mice, which were stimulated with ovalbumin in flight, showed an alteration of tolerance [79] and an increase of pro-inflammatory cytokines produced by murine splenocytes. This last observation could be mediated via extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways [80] that are sensitive to microgravity [81–83]. Finally, as C3a and C5a anaphylatoxins are powerful chemoattractants for neutrophils, monocytes, and macrophages, the modification of their production could help explain changes in leukocyte distribution noted after space missions [13,14].

In conclusion, the analysis of *P. waltl* larvae submitted to recreated-in-the-lab ISS-associated stressors show that some of them affect C3 expression, potentially increasing the risk of inflammation and associated tissue damages that could affect various organs and physiological systems during future deep-space missions. Future investigations performed on mammals embarked in a space station will be required to confirm this study and to determine if spaceflight affects the production of complement activation products that have numerous essential biological functions. Given the sensitivity of the complement system to a vast array of stimuli, strategies to mitigate the potential increase of complement activation products will likely need to target several factors including the control of microbial load inside the spacecraft and strategies to moderate stress responses such as  $\beta$ -blockers as suggested by Crucian and colleagues [84].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Animals

*P. waltl* embryos at stage 19–20 (3 days after laying) and larvae at stage 34 (11 days after laying) or 36 (13 days after laying) of development, as defined by Shi and Boucaut [85], were used in this study and reared in Evian spring water to avoid potential contamination/infection during treatments.

Three-month-old C57BL/6J male mice were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were housed in vented animal cabinets (Noroit, Bouaye, France) under controlled temperature (22 °C) and 12 h light/dark cycles. Prior to the start of the experiments, mice were allowed to rest for one week in groups of four in standard cages.

Animals were treated in accordance with the French Legislation and the Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (2010/63/UE). Local ethic committee approved the protocols (“Comité Ethique Lorrain en Matière d’Expérimentation Animale”, authorizations 04112004, and 20120008).

### 4.2. Simulation of Microgravity Using the RPM

Stage 19–20 embryos were placed in a miniaquarium (Figure 1) developed by EADS-Astrium and the German Space Agency to allow amphibian embryo development onboard the ISS. This miniaquarium was mounted on a desktop random positioning machine (RPM) (Dutch Space, Leiden, Netherlands) placed at  $20 \pm 2$  °C. RPM is a 3D-clinostat classically used to simulate microgravity. Herranz et al. [86] indicated that RPM might be used with very early larval stages (before they can swim freely). This is the case here because, due to its slow development, *P. waltl* hatching occurs 13 days after laying [85], just at the end of RPM exposure. Random speed, direction, and interval, with an angular velocity of rotation between 55 and 65 degrees per second, were applied on the RPM for 10 days. The continuous three-dimensional movement of the samples provided by the RPM randomized the direction of the gravity force, resulting in an average net force approaching zero, therefore simulating microgravity. As negative control, another miniaquarium was placed on the base of the RPM.

#### 4.3. Circadian Rhythm Perturbation

Because miniaquaria are kept in the dark in the ISS (they are stored inside the Kubik incubator (Comat Aerospace, Toulouse, France) located inside the Columbus Laboratory), we investigated the effects of continuous darkness. For that purpose, a miniaquarium containing embryos at stage 19–20 of development was kept in the dark 24h/24h during 10 days at 20 °C. A miniaquarium containing embryos at the same developmental stage was subjected for the same duration to natural light/dark cycles for comparison.

#### 4.4. Simulation of Space Radiation

The ISS radiation environment was simulated using  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  (low-linear energy transfer (LET)) and  $^{252}\text{Cf}$  neutron (high-LET particles) sources.  $^{137}\text{Cs}$  is a mono-energetic source of 0.662 MeV  $\gamma$  rays (LET up to 10 keV  $\mu\text{m}^{-1}$ ). The neutron source  $^{252}\text{Cf}$  is expelling a neutron spectrum with an average energy of 2.1 MeV (LET up to 250 keV  $\mu\text{m}^{-1}$ ) [87]. Stage 34 *P. waltl* larvae were housed in a miniaquarium and exposed to ionizing radiation under rotation at 2 r.p.m for 65 h within the calibration room facility of SCK•CEN, as previously described [27]. The total dose received during 65 h (30  $\mu\text{Sv/h}$  totaling 1.950 mSv, energy of 660 keV of  $\gamma$  rays and 31.2  $\mu\text{Sv/h}$  totaling 2.028mSv, mean energy of 2.1 MeV of neutrons) imitated the one received during a stay of 10 days in the ISS as determined by Berger et al. [47,48]. One control miniaquarium was kept outside the irradiation bunker at 20 °C for the same duration.

#### 4.5. Confinement

*P. waltl* larvae at stage 36 of development were placed in 0.5 mL Eppendorf tubes (one larvae/tube) in 400  $\mu\text{L}$  of water at 20 °C during 7 h to induce confinement. Note that the volume of water could not be lowered and the duration of this experiment could not be extended due to oxygen consumption. Larvae reared under classical conditions were used as controls.

#### 4.6. Vibration

To evaluate the impact of vibration, *P. waltl* larvae at stage 36 of development were placed in a Falcon tube containing 50 mL of water at 20 °C and subjected to vibration at 15 Hz for 5 h. Another group of *P. waltl* larvae at the same developmental stage was placed in a Falcon tube and kept at 20 °C on the bench for comparison.

#### 4.7. Combinations of Stressors

During a stay in the ISS, animals are simultaneously subjected to the stressors presented above. However, in a laboratory, it is technically impossible to combine all these stressors. Consequently, we focused on two combinations of stressors: (i) the combination of simulated microgravity with darkness and (ii) the combination of simulated radiation with darkness. In the first case, a miniaquarium containing *P. waltl* embryos at stage 19–20 of development was kept in the dark and subjected to simulated microgravity (RPM) during 10 days at 20 °C. Control embryos were placed in a miniaquarium located on the base of the RPM and subjected to normal light conditions. In the second case, a miniaquarium containing *P. waltl* embryos at stage 19–20 of development was kept in the dark during 10 days at 20 °C and subjected to simulated space radiation during the last 65 h. Embryos of the same developmental stage placed in a miniaquarium and reared under standard conditions were used as controls.

#### 4.8. Simulation of Microgravity using the Hindlimb Unloading Model

Mice were isolated five days before the beginning of the procedure in standard or hindlimb unloading (HU) cages (312 mm in length, 197 mm in width, and 260 mm in height). Mice were suspended by using a dressing retention sheet wrapped around the tail and a wire hooked on a swivel

pulley system as previously described [20,28]. During suspension, mice were provided with food and water ad libitum. Unsuspended control mice were kept individually in same size cages.

#### 4.9. Simulation of Socio-Environmental Stressors Encountered During a Space Mission Using the CUMS Model

Mice were isolated and subjected to six mild environmental or psychosocial stressors: 30° cage tilt for 1 h, 2 h, or 15 h; confinement in a small cage (110 × 80 × 80 mm) for 1 h 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) as previously described [50,88]. Control mice were housed by five in standard cages placed in another room of the animal facility.

#### 4.10. RT-qPCR

At the end of treatments, *P. waltl* larvae and mice liver were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for RNA extraction according to the instructions of the manufacturer. RNA was reverse transcribed using random primers, RNAout, and MML-V (Moloney murine leukemia virus) reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). qPCR were then performed. Primers specific for *P. waltl* and murine C3 as well as housekeeping transcripts (Table 1) were designed using the Genscript software (<http://genscript.com/ssl-bin/app/primer>) in different exons to ensure that they could not hybridize to potential traces of genomic DNA. The specificity of each primer pair was checked with BLAST (basic local alignment search tool, NCBI, Bethesda, MD, USA). The Mesa Green qPCR Master Mix (Eurogentec, Seraing, Belgium) and a Mastercycler<sup>®</sup> realplex<sup>2</sup> real-time PCR machine (Eppendorf, Hamburg, Germany) were used to performed real-time PCR. We used the following cycling protocol: 3 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 94 °C, and 30 s at the annealing temperature indicated in Table 1. Amplification efficiencies were controlled with standard curves and validated in the range of 90%–110%. Each qPCR was performed in triplicate. Data were analyzed using the Pfaffl model [89]. Relative expressions, expressed in arbitrary units (A.U.), were calculated by comparison to housekeeping transcripts using GeNorm software and Vandesompele's methodology [90].

**Table 1.** Primers used in this study. F, forward. R, reverse.

Target	Sequences	Annealing Temperature (°C)
<i>P. waltl</i> C3	F: 5'-TGGTGACAATGACACTGCCT-3'	62
	R: 5'-CATCCACCCAGATGGAGTCT-3'	
Murine C3	F: 5'-AGAGGCAAGTGCTGACCAGT-3'	62
	R: 5'-ACTGGCTGGAATCTTGATGG-3'	
<i>P. waltl</i> actin	F: 5'-TGGTCGTGACCTGACTGATT-3'	60
	R: 5'-TCACGGACAATCTCACGTTC-3'	
<i>P. waltl</i> TAFII	F: 5'-TTCACGAGCTGTCTGTGGAG-3'	60
	R: 5'-CCTGGGAAGCATTGGTAGA-3'	
<i>P. waltl</i> mtRNA16S	F: 5'-CGTGCAGAAGCGGAGATAA-3'	60
	R: 5'-TGTCGGGCTGTTGTAGGG-3'	
<i>P. waltl</i> GAPDH	F: 5'-GAAGGTAGTAAGCAACGCCTCCT-3'	65
	R: 5'-CACAGCATGTACAGTGGTCATCA-3'	
Murine Ppia	F: 5'-GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC-3'	58
	R: 5'-GCGTGTAAGTACCACCCT-3'	
Murine Eef2	F: 5'-GTGGTGGACTGTGTCTGG-3'	58
	R: 5'-CGCTGGAAGTCTGGTAGAG-3'	
Murine Rpl13	F: 5'-GGAAGCGATGAATACCAAC-3'	61
	R: 5'-CTTGTCATAGGGTGGAGCGA-3'	
Murine Eif3f	F: 5'-CATCAAGCCTATGTCAGCA-3'	61
	R: 5'-AGGTCAACTCCAATGCGTTC-3'	

#### 4.11. Western Blotting

Proteins were prepared by lysing *P. waltl* larvae in lysis buffer containing 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% glycerol, 50 mM NaF, and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> or 20–25 mg of mice liver in lysis buffer containing 15 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton X-100. Both buffers were supplemented with proteases inhibitor. Forty µg of proteins from *P. waltl* larvae and 30 µg of proteins from mice liver were heated at 95 °C for 5 min, run on 8% SDS-polyacrylamide gels, and electrotransferred to PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK). Membranes were incubated with antibodies detecting human and murine complement C3 alpha chain (GTX101316, Tebubio, Le Perray-en-Yvelines, France). As analysis revealed several bands, the specific one was identified based on its molecular weight and quantified. Then, membranes were stripped (stripping buffer from Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and incubated with an antibody against  $\alpha$ -actin for *P. waltl* samples or an antibody against GAPDH for murine samples. Immunodetection was performed using the Pierce ECL western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific, Illkrich, France). Signals were visualized by chemiluminescence (FX7, Vilbert-Lourmat, Marne la Vallée, France), analyzed by densitometry (ImageJ<sup>®</sup>, NIH, USA), and normalized to  $\alpha$ -actin or GAPDH used as housekeeping proteins.

#### 4.12. Statistics

Statistical analyses were performed using the StatView software (SAS Campus Drive Cary, NC, USA) and the Anastats website (<http://www.anastats.fr/outils.php>). Outlier values were determined by a boxplot of each studied group. When normality and homogeneity of variances were ascertained, as determined by Kolmogorov-Smirnov and Fisher tests, respectively, student's *t*-tests were used to perform two groups' comparisons. When data were not normally distributed or if there was a heterogeneity of variances, Mann–Whitney tests were used. For three groups' comparisons, homogeneity of variances was checked using the Levene test. If there was a heterogeneity of variances, Kruskal–Wallis tests were performed followed by a Dunn test for two by two comparisons. In the other cases, ANOVA tests were done followed by a Tukey–Kramer test. Stars indicate statistically significant differences. T indicates trends determined using a 10% alpha risk. All results are shown as means  $\pm$  SEM.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.-P.F.; Formal analysis, J.J. and S.G.; Funding acquisition, S. B. and J.-P.F.; Investigation, N.G., J.J., S.B., and S.G.; Supervision, J.-P.F.; Validation, N.G., J.J., S.K., and S.G.; Visualization, J.J. and S.G.; Writing—original draft, J.-P.F.; Writing—review and editing, N.G., J.J., S.K., S.B., S.G., and J.-P.F.

**Funding:** This research was funded by the French National Space Agency (“Centre National d’Etudes Spatiales”, grants DAR 4800000786, DAR 4800000841, and DAR 4800000894), the French Ministry of Higher Education and Research, the Université de Lorraine, the Région Lorraine, and the Belgian Science Policy (grant 42-000-90-380, C4000109861 ESA/PRODEX IMPULSE contract).

**Acknowledgments:** We thank C. Tankosic for her efficient technical support and SCK•CEN staff for support during irradiation experiments.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The sponsors had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study.

#### Abbreviations

A.U.	Arbitrary unit
BLAST	Basic local alignment search tool
EADS	European aeronautic defense and space company
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FXa	Factor Xa
FXIa	Factor XIa
HU	Hindlimb unloading
ISS	International space station



MHC	Major histocompatibility complex
MML-V	Moloney murine leukemia virus
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative PCR
RPM	Random positioning machine
ROS	Reactive oxygen species
TLR	Toll-like receptors

## References

- Crucian, B.; Stowe, R.P.; Mehta, S.; Quiariarte, H.; Pierson, D.; Sams, C. Alterations in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight. *Npj Microgravity* **2015**, *1*, 15013. [[CrossRef](#)]
- Mehta, S.K.; Laudenslager, M.L.; Stowe, R.P.; Crucian, B.E.; Feiveson, A.H.; Sams, C.F.; Pierson, D.L. Latent virus reactivation in astronauts on the international space station. *NPJ Microgravity* **2017**, *3*, 11. [[CrossRef](#)]
- Crucian, B.; Babiak-Vazquez, A.; Johnston, S.; Pierson, D.L.; Ott, C.M.; Sams, C. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *Int. J. Gen. Med.* **2016**, *9*, 383–391. [[CrossRef](#)]
- Crucian, B.; Johnston, S.; Mehta, S.; Stowe, R.; Uchakin, P.; Quiariarte, H.; Pierson, D.; Laudenslager, M.L.; Sams, C. A case of persistent skin rash and rhinitis with immune system dysregulation onboard the International Space Station. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2016**, *4*, 759–762.e8. [[CrossRef](#)]
- Crucian, B.; Stowe, R.; Quiariarte, H.; Pierson, D.; Sams, C. Monocyte phenotype and cytokine production profiles are dysregulated by short-duration spaceflight. *Aviat. Space Environ. Med.* **2011**, *82*, 857–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kaur, I.; Simons, E.R.; Kapadia, A.S.; Ott, C.M.; Pierson, D.L. Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **2008**, *15*, 1523–1528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rykova, M.P.; Antropova, E.N.; Larina, I.M.; Morukov, B.V. Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. *Acta Astronaut.* **2008**, *63*, 697–705. [[CrossRef](#)]
- Brungs, S.; Kolanus, W.; Hemmersbach, R. Syk phosphorylation—a gravisensitive step in macrophage signalling. *Cell Commun. Signal. CCS* **2015**, *13*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kaur, I.; Simons, E.R.; Castro, V.A.; Mark Ott, C.; Pierson, D.L. Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain. Behav. Immun.* **2004**, *18*, 443–450. [[CrossRef](#)]
- Cogoli, A.; Tschopp, A.; Fuchs-Bislin, P. Cell sensitivity to gravity. *Science* **1984**, *225*, 228–230. [[CrossRef](#)]
- Cogoli, A. The effect of space flight on human cellular immunity. *Environ. Med. Annu. Rep. Res. Inst. Environ. Med. Nagoya Univ.* **1993**, *37*, 107–116.
- Gridley, D.S.; Slater, J.M.; Luo-Owen, X.; Rizvi, A.; Chapes, S.K.; Stodieck, L.S.; Ferguson, V.L.; Pecaut, M.J. Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **2009**, *106*, 194–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Frippiat, J.-P.; Crucian, B.E.; de Quervain, D.J.-F.; Grimm, D.; Montano, N.; Praun, S.; Roozendaal, B.; Schelling, G.; Thiel, M.; Ullrich, O.; et al. Towards human exploration of space: The THESEUS review series on immunology research priorities. *NPJ Microgravity* **2016**, *2*, 16040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Guéguinou, N.; Huin-Schohn, C.; Bascove, M.; Bueb, J.-L.; Tschirhart, E.; Legrand-Frossi, C.; Frippiat, J.-P. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *86*, 1027–1038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Frippiat, J.-P. Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. *Mol. Immunol.* **2013**, *56*, 434–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bascove, M.; Huin-Schohn, C.; Guéguinou, N.; Tschirhart, E.; Frippiat, J.-P. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2009**, *23*, 1607–1615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boxio, R.; Dournon, C.; Frippiat, J.-P. Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **2005**, *98*, 905–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

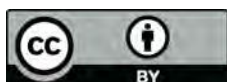
18. Bascove, M.; Guéguinou, N.; Schaerlinger, B.; Gauquelin-Koch, G.; Frippiat, J.-P. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2011**, *25*, 2947–2955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Rettig, T.A.; Bye, B.A.; Nishiyama, N.C.; Hlavacek, S.; Ward, C.; Pecaut, M.J.; Chapes, S.K. Effects of skeletal unloading on the antibody repertoire of tetanus toxoid and/or CpG treated C57BL/6J mice. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gaignier, F.; Schenten, V.; De Carvalho Bittencourt, M.; Gauquelin-Koch, G.; Frippiat, J.-P.; 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. [[CrossRef](#)]
21. Guéguinou, N.; Bojados, M.; Jamon, M.; Derradji, H.; Baatout, S.; Tschirhart, E.; Frippiat, J.-P.; Legrand-Frossi, C. Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 137–147. [[CrossRef](#)]
22. Vacek, A.; Michurina, T.V.; Serova, L.V.; Rotkovská, D.; Bartoníková, A. 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)* **1991**, *37*, 35–41.
23. Ichiki, A.T.; Gibson, L.A.; Jago, T.L.; Strickland, K.M.; Johnson, D.L.; Lange, R.D.; Allebban, Z. Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.* **1996**, *60*, 37–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Davis, T.A.; Wiesmann, W.; Kidwell, W.; Cannon, T.; Kerns, L.; Serke, C.; Delaplaine, T.; Pranger, A.; Lee, K.P. Effect of spaceflight on human stem cell hematopoiesis: Suppression of erythropoiesis and myelopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **1996**, *60*, 69–76. [[CrossRef](#)]
25. Ortega, M.T.; Pecaut, M.J.; Gridley, D.S.; Stodieck, L.S.; Ferguson, V.; Chapes, S.K. Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **2009**, *106*, 548–555. [[CrossRef](#)]
26. Sotnezova, E.V.; Markina, E.A.; Andreeva, E.R.; Buravkova, L.B. Myeloid Precursors in the Bone Marrow of Mice after a 30-Day Space Mission on a Bion-M1 Biosatellite. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2017**, *162*, 496–500. [[CrossRef](#)]
27. Huin-Schohn, C.; Guéguinou, N.; Schenten, V.; Bascove, M.; Gauquelin-Koch, G.; Baatout, S.; Tschirhart, E.; Frippiat, J.-P. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2013**, *27*, 333–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lescale, C.; Schenten, V.; Djeghloul, D.; Bennabi, M.; Gaignier, F.; Vandamme, K.; Strazielle, C.; Kuzniak, I.; Petite, H.; Dosquet, C.; et al. Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2015**, *29*, 455–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Tascher, G.; Gerbaix, M.; Maes, P.; Chazarin, B.; Ghislin, S.; Antropova, E.; Vassilieva, G.; Ouzren-Zarhloul, N.; Gauquelin-Koch, G.; Vico, L.; et al. Analysis of femurs from mice embarked on board BION-M1 biosatellite reveals a decrease in immune cell development, including B cells, after 1 wk of recovery on Earth. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2018**, fj201801463R. [[CrossRef](#)]
30. Woods, C.C.; Banks, K.E.; Gruener, R.; DeLuca, D. Loss of T cell precursors after spaceflight and exposure to vector-averaged gravity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2003**, *17*, 1526–1528. [[CrossRef](#)]
31. Woods, C.C.; Banks, K.E.; Lebsack, T.W.; White, T.C.; Anderson, G.A.; Maccallum, T.; Gruener, R.; DeLuca, D. Use of a microgravity organ culture dish system to demonstrate the signal dampening effects of modeled microgravity during T cell development. *Dev. Comp. Immunol.* **2005**, *29*, 565–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ghislin, S.; Ouzren-Zarhloul, N.; Kaminski, S.; Frippiat, J.-P. Hypergravity exposure during gestation modifies the TCR $\beta$  repertoire of newborn mice. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ricklin, D.; Hajishengallis, G.; Yang, K.; Lambris, J.D. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 785–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hajishengallis, G.; Lambris, J.D. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends Immunol.* **2010**, *31*, 154–163. [[CrossRef](#)]
35. Dunkelberger, J.R.; Song, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* **2010**, *20*, 34–50. [[CrossRef](#)]



36. Jalili, A.; Shirvaikar, N.; Marquez-Curtis, L.; Qiu, Y.; Korol, C.; Lee, H.; Turner, A.R.; Ratajczak, M.Z.; Janowska-Wieczorek, A. Fifth complement cascade protein (C5) cleavage fragments disrupt the SDF-1/CXCR4 axis: Further evidence that innate immunity orchestrates the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp. Hematol.* **2010**, *38*, 321–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Flierman, R.; Daha, M.R. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology* **2007**, *212*, 363–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Trouw, L.A.; Blom, A.M.; Gasque, P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol. Immunol.* **2008**, *45*, 1199–1207. [[CrossRef](#)]
39. Markiewski, M.M.; DeAngelis, R.A.; Lambris, J.D. Liver inflammation and regeneration: Two distinct biological phenomena or parallel pathophysiologic processes? *Mol. Immunol.* **2006**, *43*, 45–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Mastellos, D.C.; Deangelis, R.A.; Lambris, J.D. Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. *Semin. Immunol.* **2013**, *25*, 29–38. [[CrossRef](#)]
41. Markiewski, M.M.; Nilsson, B.; Ekdahl, K.N.; Mollnes, T.E.; Lambris, J.D. Complement and coagulation: Strangers or partners in crime? *Trends Immunol.* **2007**, *28*, 184–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Alexander, J.J.; Anderson, A.J.; Barnum, S.R.; Stevens, B.; Tenner, A.J. The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation–neuro-protection and -degeneration. *J. Neurochem.* **2008**, *107*, 1169–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Shinjyo, N.; Ståhlberg, A.; Dragunow, M.; Pekny, M.; Pekna, M. Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **2009**, *27*, 2824–2832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Nonaka, M.; Yoshizaki, F. Evolution of the complement system. *Mol. Immunol.* **2004**, *40*, 897–902. [[CrossRef](#)]
45. Guéguinou, N.; Huin-Schohn, C.; Ouzren-Zarhloul, N.; Ghislin, S.; Frippiat, J.-P. Molecular cloning and expression analysis of *Pleurodeles waltl* complement component C3 under normal physiological conditions and environmental stresses. *Dev. Comp. Immunol.* **2014**, *46*, 180–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Liszewski, M.K.; Kolev, M.; Le Friec, G.; Leung, M.; Bertram, P.G.; Fara, A.F.; Subias, M.; Pickering, M.C.; Drouet, C.; Meri, S.; et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* **2013**, *39*, 1143–1157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Berger, T.; Przybyla, B.; Matthä, D.; Reitz, G.; Burmeister, S.; Labrenz, J.; Bilski, P.; Horwacik, T.; Twardak, A.; Hajek, M.; et al. DOSIS & DOSIS 3D: Long-term dose monitoring onboard the Columbus Laboratory of the International Space Station (ISS). *J. Space Weather Space Clim.* **2016**, *6*, A39.
48. Berger, T.; Burmeister, S.; Matthä, D.; Przybyla, B.; Reitz, G.; Bilski, P.; Hajek, M.; Sihver, L.; Szabo, J.; Ambrozova, I.; et al. DOSIS & DOSIS 3D: Radiation measurements with the DOSTEL instruments onboard the Columbus Laboratory of the ISS in the years 2009–2016. *J. Space Weather Space Clim.* **2017**, *7*, A8.
49. Globus, R.K.; Morey-Holton, E. Hindlimb unloading: Rodent analog for microgravity. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **2016**, *120*, 1196–1206. [[CrossRef](#)]
50. Gagnier, F.; Legrand-Frossi, C.; Stragier, E.; Mathiot, J.; Merlin, J.-L.; Cohen-Salmon, C.; Lanfumey, L.; Frippiat, J.-P. A Model of Chronic Exposure to Unpredictable Mild Socio-Environmental Stressors Replicates Some Spaceflight-Induced Immunological Changes. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Schaerlinger, B.; Frippiat, J.-P. IgX antibodies in the urodele amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Dev. Comp. Immunol.* **2008**, *32*, 908–915. [[CrossRef](#)]
52. Bascove, M.; Frippiat, J.-P. Molecular characterization of *Pleurodeles waltl* activation-induced cytidine deaminase. *Mol. Immunol.* **2010**, *47*, 1640–1649. [[CrossRef](#)]
53. Fonte, C.; Gruez, A.; Ghislin, S.; Frippiat, J.-P. The urodele amphibian *Pleurodeles waltl* has a diverse repertoire of immunoglobulin heavy chains with polyreactive and species-specific features. *Dev. Comp. Immunol.* **2015**, *53*, 371–384. [[CrossRef](#)]
54. Kolev, M.; Le Friec, G.; Kemper, C. Complement–tapping into new sites and effector systems. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 811–820. [[CrossRef](#)]
55. Surace, L.; Lysenko, V.; Fontana, A.O.; Cecconi, V.; Janssen, H.; Bicvic, A.; Okoniewski, M.; Pruschy, M.; Dummer, R.; Neefjes, J.; et al. Complement is a central mediator of radiotherapy-induced tumor-specific immunity and clinical response. *Immunity* **2015**, *42*, 767–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Schmitt, D.A.; Schwarzenberg, M.; Tkaczuk, J.; Hebrard, S.; Brandenberger, G.; Mauco, G.; Cogoli-Greuter, M.; Abbal, M. Head-down tilt bed rest and immune responses. *Pflugers Arch.* **2000**, *441*, R79–R84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Reis, E.S.; Lange, T.; Köhl, G.; Herrmann, A.; Tschulakow, A.V.; Naujoks, J.; Born, J.; Köhl, J. Sleep and circadian rhythm regulate circulating complement factors and immunoregulatory properties of C5a. *Brain. Behav. Immun.* **2011**, *25*, 1416–1426. [[CrossRef](#)]
58. Hollander, J.; Gore, M.; Fiebig, R.; Mazzeo, R.; Ohishi, S.; Ohno, H.; Ji, L.L. Spaceflight downregulates antioxidant defense systems in rat liver. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 385–390. [[CrossRef](#)]
59. Rizzo, A.M.; Rossi, F.; Zava, S.; Montorfano, G.; Adorni, L.; Cotronei, V.; Zanini, A.; Berra, B. Antioxidant metabolism in *Xenopus laevis* embryos is affected by stratospheric balloon flight. *Cell Biol. Int.* **2007**, *31*, 716–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. De Luca, C.; Deeva, I.; Mariani, S.; Maiani, G.; Stancato, A.; Korkina, L. Monitoring antioxidant defenses and free radical production in space-flight, aviation and railway engine operators, for the prevention and treatment of oxidative stress, immunological impairment, and pre-mature cell aging. *Toxicol. Ind. Health* **2009**, *25*, 259–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Tahimic, C.G.T.; Globus, R.K. Redox Signaling and Its Impact on Skeletal and Vascular Responses to Spaceflight. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Collard, C.D.; Lekowski, R.; Jordan, J.E.; Agah, A.; Stahl, G.L. Complement activation following oxidative stress. *Mol. Immunol.* **1999**, *36*, 941–948. [[CrossRef](#)]
63. Collard, C.D.; Väkevä, A.; Morrissey, M.A.; Agah, A.; Rollins, S.A.; Reenstra, W.R.; Buras, J.A.; Meri, S.; Stahl, G.L. Complement activation after oxidative stress: Role of the lectin complement pathway. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1549–1556. [[CrossRef](#)]
64. Hart, M.L.; Walsh, M.C.; Stahl, G.L. Initiation of complement activation following oxidative stress. In vitro and in vivo observations. *Mol. Immunol.* **2004**, *41*, 165–171. [[CrossRef](#)]
65. Baqai, F.P.; Gridley, D.S.; Slater, J.M.; Luo-Owen, X.; Stodieck, L.S.; Ferguson, V.; Chapes, S.K.; Pecaut, M.J. Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **2009**, *106*, 1935–1942. [[CrossRef](#)]
66. Ishihara, A.; Fujino, H.; Nagatomo, F.; Takeda, I.; Ohira, Y. Gene expression levels of heat shock proteins in the soleus and plantaris muscles of rats after hindlimb suspension or spaceflight. *J. Physiol. Sci. JPS* **2008**, *58*, 413–417. [[CrossRef](#)]
67. Stott, B.; Korbely, M. Activation of complement C3, C5, and C9 genes in tumors treated by photodynamic therapy. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **2007**, *56*, 649–658. [[CrossRef](#)]
68. McLin, V.A.; Hu, C.-H.; Shah, R.; Jamrich, M. Expression of complement components coincides with early patterning and organogenesis in *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev. Biol.* **2008**, *52*, 1123–1133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Carmona-Fontaine, C.; Theveneau, E.; Tzekou, A.; Tada, M.; Woods, M.; Page, K.M.; Parsons, M.; Lambris, J.D.; Mayor, R. Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. *Dev. Cell* **2011**, *21*, 1026–1037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Amara, U.; Flierl, M.A.; Rittirsch, D.; Klos, A.; Chen, H.; Acker, B.; Brückner, U.B.; Nilsson, B.; Gebhard, F.; Lambris, J.D.; et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2010**, *185*, 5628–5636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Kimzey, S.L.; Ritzmann, S.E.; Mengel, C.E.; Fischer, C.L. Skylab experiment results: Hematology studies. *Acta Astronaut.* **1975**, *2*, 141–154. [[CrossRef](#)]
72. Larina, I.M.; Percy, A.J.; Yang, J.; Borchers, C.H.; Nosovsky, A.M.; Grigoriev, A.I.; Nikolaev, E.N. Protein expression changes caused by spaceflight as measured for 18 Russian cosmonauts. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8142. [[CrossRef](#)]
73. Lewis, M.L.; Reynolds, J.L.; Cubano, L.A.; Hatton, J.P.; Lawless, B.D.; Piepmeier, E.H. Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1998**, *12*, 1007–1018. [[CrossRef](#)]
74. Sharma, C.S.; Sarkar, S.; Periyakaruppan, A.; Ravichandran, P.; Sadanandan, B.; Ramesh, V.; Thomas, R.; Hall, J.C.; Wilson, B.L.; Ramesh, G.T. Simulated microgravity activates apoptosis and NF-kappaB in mice testis. *Mol. Cell. Biochem.* **2008**, *313*, 71–78. [[CrossRef](#)]

75. Kang, C.-Y.; Zou, L.; Yuan, M.; Wang, Y.; Li, T.-Z.; Zhang, Y.; Wang, J.-F.; Li, Y.; Deng, X.-W.; Liu, C.-T. Impact of simulated microgravity on microvascular endothelial cell apoptosis. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2011**, *111*, 2131–2138. [[CrossRef](#)]
76. Lin, S.-C.; Gou, G.-H.; Hsia, C.-W.; Ho, C.-W.; Huang, K.-L.; Wu, Y.-F.; Lee, S.-Y.; Chen, Y.-H. Simulated Microgravity Disrupts Cytoskeleton Organization and Increases Apoptosis of Rat Neural Crest Stem Cells Via Upregulating CXCR4 Expression and RhoA-ROCK1-p38 MAPK-p53 Signaling. *Stem Cells Dev.* **2016**, *25*, 1172–1193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Strainic, M.G.; Liu, J.; Huang, D.; An, F.; Lalli, P.N.; Muqim, N.; Shapiro, V.S.; Dubyak, G.R.; Heeger, P.S.; Medof, M.E. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity* **2008**, *28*, 425–435. [[CrossRef](#)]
78. Weaver, D.J.; Reis, E.S.; Pandey, M.K.; Köhl, G.; Harris, N.; Gerard, C.; Köhl, J. C5a receptor-deficient dendritic cells promote induction of Treg and Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* **2010**, *40*, 710–721. [[CrossRef](#)]
79. Chang, T.T.; Spurlock, S.M.; Candelario, T.L.T.; Grenon, S.M.; Hughes-Fulford, M. Spaceflight impairs antigen-specific tolerance induction in vivo and increases inflammatory cytokines. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2015**, *29*, 4122–4132. [[CrossRef](#)]
80. Hawlisch, H.; Belkaid, Y.; Baelder, R.; Hildeman, D.; Gerard, C.; Köhl, J. C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. *Immunity* **2005**, *22*, 415–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Wang, C.; Chen, H.; Luo, H.; Zhu, L.; Zhao, Y.; Tian, H.; Wang, R.; Shang, P.; Zhao, Y. Microgravity activates p38 MAPK-C/EBP $\beta$  pathway to regulate the expression of arginase and inflammatory cytokines in macrophages. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **2015**, *64*, 303–311. [[CrossRef](#)]
82. Tauber, S.; Hauschild, S.; Crescio, C.; Secchi, C.; Paulsen, K.; Pantaleo, A.; Saba, A.; Buttron, I.; Thiel, C.S.; Cogoli, A.; et al. Signal transduction in primary human T lymphocytes in altered gravity—results of the MASER-12 suborbital space flight mission. *Cell Commun. Signal. CCS* **2013**, *11*, 32. [[CrossRef](#)]
83. Kim, J.; Montagne, K.; Nemoto, H.; Ushida, T.; Furukawa, K.S. Hypergravity down-regulates c-fos gene expression via ROCK/Rho-GTP and the PI3K signaling pathway in murine ATDC5 chondroprogenitor cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0185394. [[CrossRef](#)]
84. Crucian, B.E.; Choukèr, A.; Simpson, R.J.; Mehta, S.; Marshall, G.; Smith, S.M.; Zwart, S.R.; Heer, M.; Ponomarev, S.; Whitmire, A.; et al. Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1437. [[CrossRef](#)]
85. Shi, D.L.; Boucaut, J.C. The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah). *Int. J. Dev. Biol.* **1995**, *39*, 427–441.
86. Herranz, R.; Anken, R.; Boonstra, J.; Braun, M.; Christianen, P.C.M.; de Geest, M.; Hauslage, J.; Hilbig, R.; Hill, R.J.A.; Lebert, M.; et al. Ground-based facilities for simulation of microgravity: Organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology* **2013**, *13*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Vanhavere, F.; Coeck, M. Comparison between thermoluminescence and electronic dosimetry results at the Belgian Nuclear Research Centre. *Radiat. Prot. Dosimetry* **2001**, *96*, 105–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Fonte, C.; Kaminski, S.; Vanet, A.; Lanfumey, L.; Cohen-Salmon, C.; Ghislin, S.; Fripiat, J.-P. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR- $\beta$  repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2019**, *33*, 896–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)]
90. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, RESEARCH0034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## **ANNEXE 2 : Modifications de la gravité et développement des cellules immunitaires**

Les vols spatiaux consistent en une combinaison de stress mécaniques et socio-environnementaux capables d'affaiblir le système immunitaire (SI) [686]. Cette baisse de l'efficacité du SI, combinée à la diminution de celle de certains antibiotiques [631] et à l'augmentation de la virulence de certains pathogènes [627,803] en condition de vol, pourrait augmenter la susceptibilité des astronautes aux infections. Ceci représente un danger majeur pour les missions spatiales de longue durée. Cependant, l'impact des vols spatiaux et des changements gravitaires sur l'immunité humorale et le développement des cellules immunitaires sont peu connus.

Les résultats obtenus par notre équipe ont mis en évidence des changements qualitatifs et quantitatifs dans la production d'anticorps (Ac) par *P. waltl* en réponse à une stimulation antigénique en vol. Des changements d'expression de gènes impliqués dans la formation d'Ac fonctionnels ainsi qu'une diminution des mutations somatiques indispensables à la formation d'un site de fixation à l'Ag de haute affinité ont notamment été montrés [567]. De plus, une variation significative du taux de transcrits des chaînes lourdes d'IgM (due aux variations de gravité) ainsi qu'une altération de l'expression d'Ikaros, un facteur de transcription indispensable au développement des LB, ont été montrées chez des larves de *P. waltl* s'étant développées à bord de l'ISS [568] suggérant que la lymphopoïèse B pourrait être affectée en vol. Cette hypothèse a été vérifiée chez la souris en utilisant un modèle de suspension anti-orthostatique induisant une diminution de nombreux stades de développement des LB [570].

Notre équipe s'est également intéressée aux effets de l'hypergravité sur la lymphopoïèse T, déjà connue pour être sensible à la microgravité. Des souris gestantes ont été placées à 2g et 85% de différence des chaînes  $\beta$  du TCR ainsi qu'une altération de la fréquence des segments V $\beta$  et J $\beta$  utilisés pour leur formation ont été observées [569].

Ainsi, nous avons mis en évidence une réduction de la lymphopoïèse B en condition de microgravité réelle et simulée ainsi qu'une modification importante du répertoire du TCR des lymphocytes T lorsque les souris se sont développées en hypergravité. En conclusion, en plus de perturber la fonction de cellules immunitaires matures, les vols spatiaux et les variations de gravité affectent également les lymphopoïèses T et B ce qui contribue certainement à l'affaiblissement du SI.



## **CHAPITRE DE LIVRE : Gravity changes and immune cell development**

---

**C. Fonte, J. Jeandel, S. Kaminski, S. Ghislin and J.-P. Fripiat**

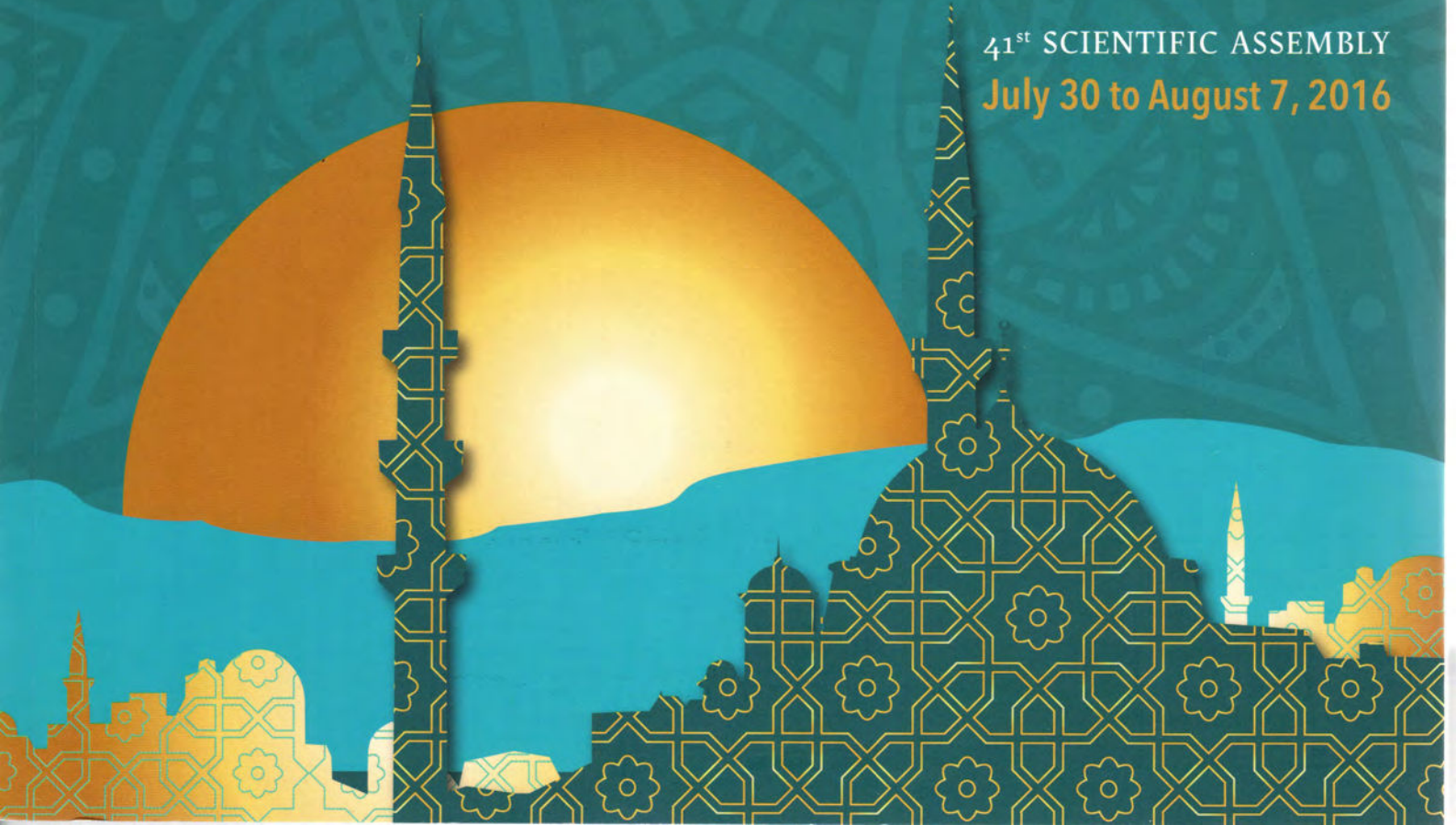






French Report to  
**Cospar 2016**  
*Istanbul*

41<sup>st</sup> SCIENTIFIC ASSEMBLY  
July 30 to August 7, 2016





C. Fonte, J. Jeandel, S. Kaminski, S. Ghislin and J.-P. Fripiat

EA7300, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

## *Life Sciences in Space*

### Gravity changes and immune cell development

While the effects of spaceflight on innate immunity and cell mediation are starting to be better understood, its impacts on humoral immunity and immune cell development are much less well known. We therefore studied these impacts on the amphibian *Pleurodeles waltl* and the mouse. We highlighted qualitative and quantitative changes in the production of antibodies in response to antigen stimulation in flight, a reduction in B lymphopoiesis in real and simulated microgravity conditions, and a significant change in the repertoire of antigen receptors of T lymphocytes when mice develop in hypergravity.

Spaceflight entails a combination of mechanical and socio-environmental stresses (accelerations on liftoff and landing, microgravity, vibrations, confinement, social isolation, radiation and altered circadian rhythms) that weaken the immune system in humans and animals [1].

These effects induce a reduction in phagocytary and oxidative function in neutrophils and monocytes, in production of Th1 cytokines, and in activity of natural killer (NK) cells and T lymphocytes. Moreover, the distribution of certain leucocytes also appears to be affected. This weakening of immunity – combined with reduced activity of certain antibiotics and increased aggressiveness of pathogens in space conditions – may increase susceptibility to infection, a key concern for future long-duration space missions (Fig. 2).

With regard to humoral immunity, we showed that spaceflight has a qualitative and quantitative effect on the production of antibodies in response to antigen stimulation. Significant changes in the expression of the gene segments required to build a functional antibody gene were observed. Moreover, we noted two times fewer somatic mutations in the antibodies of animals immunized in flight; such mutations are important, as they increase the affinity of the antibody's antigen-binding site to the antigen.

Interestingly, it has been shown that spaceflight reduces granulocyte and monocyte progenitor cells in rodents that have flown and been subjected to anti-orthostatic suspension. More recently, Ortega et al. [2] have shown changes in maturation of granulocyte cells in mice after spaceflight. It would appear that T lymphopoiesis is sensitive to microgravity, but nothing is known about B lymphopoiesis. We therefore studied this question using two models: the

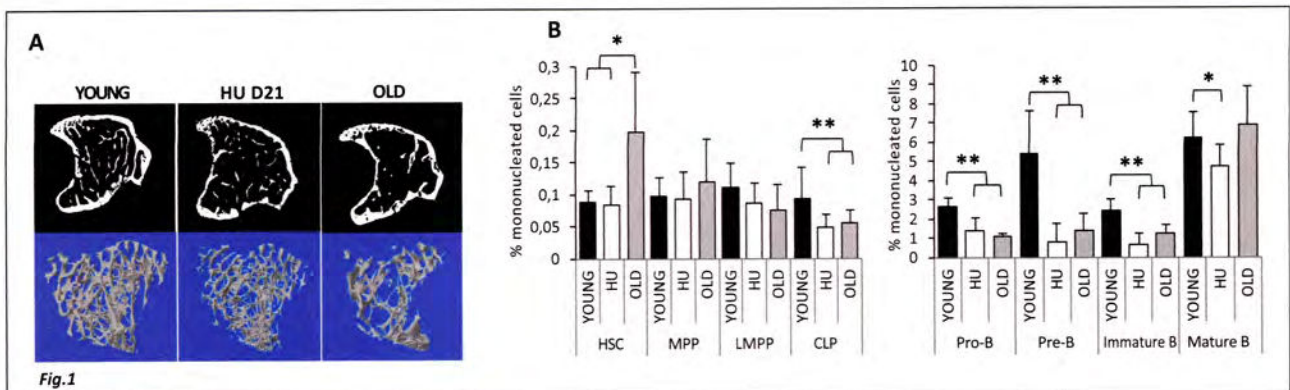
amphibian *P. waltl*, well suited to space experiments and possessing all the key elements of the mammal immune system, and the mouse.

#### Gravity and lymphopoiesis

To ascertain if a change in gravity affects specific immunity, we left embryos of *P. waltl* to develop for 10 days on the International Space Station (ISS). The study of the larvae thus obtained after they returned to Earth revealed a significant change in the amount of mRNA in IgM heavy chains. To establish the cause, we reproduced in the laboratory the main stresses to which the embryos were subjected during their development (radiation, altered circadian rhythms, hypergravity, microgravity, thermal shock during atmospheric re-entry). This study showed that it is the perturbing effects of gravity, and not the other stresses encountered during the mission, that alter the expression of mRNA in IgM heavy chains. A perturbation of the Ikaros expression encoding the transcription factors required for lymphopoiesis is associated with this change in the expression of IgMs, which suggests that B lymphopoiesis could be affected in space conditions [3].

We then verified this hypothesis on mice aged four months suspended for 21 days with their hind limbs unloaded. It was shown that this model induces gradual changes in bone structure similar to those observed in older mice (Fig. 1A), as well as a reduction in B lymphopoiesis. We recorded fewer common lymphoid progenitors (CLPs) and pro-B, pre-B and immature B cells in the femoral bone marrow of suspended mice and older mice with respect to the four-month-old control group (Fig. 1B). Interleukin-7 plays an important role in differentiation of B lymphocytes. We therefore studied its receptor signaling and recorded a significant decrease in pro-B cells of suspended and older

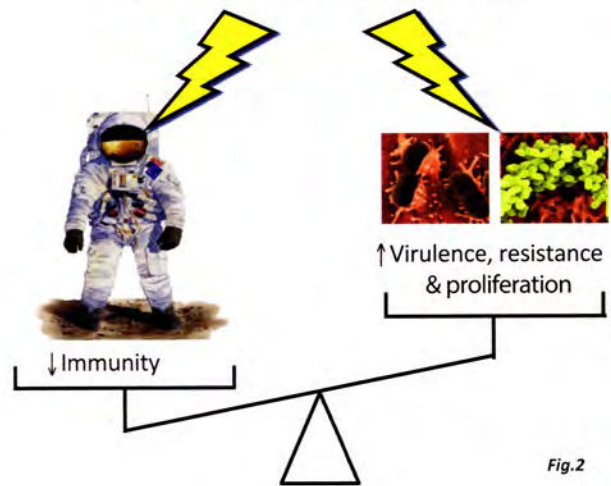




**Fig. 1:** Effects of simulated microgravity by anti-orthostatic suspension (HU) on murine bone structure and B lymphopoiesis. (A) Segmented cross-sectional images of the proximal tibia (top) and 3D reconstruction of metaphyseal trabecular bone separated from the cortex (bottom) for four-month-old control (YOUNG), 21-day-HU (HU) and 19-month-old (OLD) mice. (B) Frequencies of early hematopoietic progenitors and B lineage cells in the femurs of young, HU and old mice. © J. P. Fripiat University Nancy (France).

**Fig. 2:** Spaceflight-associated environmental modifications weaken the immune system but have a positive impact on the virulence, resistance and proliferation of pathogens. This imbalance may increase susceptibility to infections. © J. P. Fripiat University Nancy (France).

**Environmental changes associated with spaceflight (microgravity, etc.)**



mice. This study confirms the decrease in B lymphopoiesis in flight and shows that hind limb unloading induces changes similar to those observed in older mice [4].

As previous studies suggest that T lymphopoiesis could be sensitive to microgravity, we got mice to mate at 2g so that gestation and birth took place in hypergravity. Analysis of the thymus of mice subjected to 2g revealed an alteration in signaling by the T cell antigen receptor (TCR). We then studied the TCR's  $\beta$ -chain repertoire. Our work revealed that hypergravity induces changes in the frequencies of  $V\beta$  and  $J\beta$  gene segments used to build these chains. The basic result is that approximately 85% of the TCR's  $\beta$ -chains in the mice subjected to 2g are different to those in control mice born at 1g. Lastly, the  $V\beta$  gene segments whose expressions are modified in the thymus of the 2g mice would appear to be clustered in the TCR $\beta$  locus on chromosome 6. This suggests local changes in the chromatin structure. This hypothesis matches a study that has shown that simulated microgravity induces epigenetic changes in human lymphocytes [5]. All of these data show that development in hypergravity modifies T lymphopoiesis and the repertoire of T lymphocyte antigen receptors, which could affect the host's immune defenses [6].

It therefore appears that as well as affecting the functions of mature immune cells, space conditions and variations in gravity affect B and T lymphopoiesis, which certainly contributes to a weakening of the immune system in spaceflight.

**REFERENCES**

[1] Fripiat, J.-P., (2013), Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation, *Mol. Immunol.*, **56**, 434-441.

[2] Ortega, M.T., et al. (2009), Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985, **106**, 548-555.

[3] Huin-Schohn, C., et al. (2013), Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **27**, 333-341.

[4] Lescale, C., et al. (2015) Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **29**, 455-463.

[5] Singh, K. P., et al. (2010), Simulated microgravity-induced epigenetic changes in human lymphocytes, *J. Cell. Biochem.*, **111**, 123-129.

[6] Ghislin, S., et al. (2015), Hypergravity exposure during gestation modifies the TCR $\beta$  repertoire of newborn mice, *Sci. Rep.*, **5**, 9318.



### **ANNEXE 3 : Modifications du système immunitaire associées aux vols spatiaux**

Au cours des vols spatiaux, l'organisme est sujet à une combinaison de stress unique affectant la grande majorité des processus physiologiques et notamment le système immunitaire. En effet, près de 50% des astronautes ayant effectué des missions de 6 mois à bord de l'ISS ont rencontré des problèmes d'ordre immunologique [573]. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux effets des vols spatiaux et des changements gravitaires sur le développement et/ou la fonction des cellules de l'immunité innée et adaptative.

Les lymphopoïèses B [568,570,695] et T [696] sont affectées par la microgravité et les vols spatiaux. Les hormones de stress telles que les glucocorticoïdes sont susceptibles d'entraîner ce type d'altération et pourraient par conséquent y participer [804–806]. De plus, la prolifération des LB et LT est réduite chez des souris exposées à des changements gravitaires [618,663]. De nombreuses études concernant les LT ont montré une réduction de leur activité en condition de microgravité réelle et simulée due à la modification de l'expression de gènes essentiels à leur fonction et impliqués dans de nombreux mécanismes (e.g. production de l'IL-2 et de son récepteur [666], transduction du signal [670,753,807] et régulation du cycle cellulaire [808]. Concernant les LB et la réponse humorale, les stress rencontrés lors de vols spatiaux affectent quantitativement et qualitativement la production d'Ac en réponse à une stimulation antigénique. Les vols spatiaux diminuent également les capacités phagocytaires des neutrophiles [652,653] et des monocytes [682,683]. Concernant les cellules présentatrices de l'Ag, seule une étude a montré que la microgravité réduisait leur capacité phagocytaire ainsi que l'expression membranaire de molécules de co-stimulation et d'adhésion impliquées dans la présentation des peptides antigéniques [673].

De manière intéressante, certains changements d'ordre immunologique observés chez les astronautes peuvent également être retrouvés au cours du vieillissement comme par exemple la régression du thymus, l'augmentation de la susceptibilité aux infections, les altérations fonctionnelles et développementales de cellules du SI, la réactivation de virus latents [809,810] et les altérations de production d'Ac. Ainsi, la libération d'hormones de stress ainsi que les variations de gravité ayant lieu au cours des vols spatiaux semblent entraîner un affaiblissement et un vieillissement précoce du SI.



## **CHAPITRE DE LIVRE : Spaceflight-associated immune system modifications**

---

**J. Jeandel, C. Fonte, G. Calcagno, J. Bonnefoy, S. Ghislin, S. Kaminski and J.-P. Fripiat**



# Spaceflight-associated immune system modifications

Jeremy Jeandel, Coralie Fonte, Gaetano Calcagno, Julie Bonnefoy, Stéphanie Ghislin, Sandra Kaminski and Jean-Pol Frippiat. 'Stress Immunity Pathogens' Unit, EA 7300, Lorraine University, Faculty of Medicine, 9 Avenue de la Forêt de Haye. F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France, jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr.

## Abstract

Spaceflight is an adverse environment characterized by a unique combination of stressors affecting almost all physiological systems, including the immune system. Indeed, several studies have shown that about 50% of the astronauts have faced immunological troubles. Here, we will review how spaceflight affects immune cell development, innate as well as adaptive immunity, required to ensure an efficient protection of the host, with a particular focus on T- and B-cells. Indeed, to better appreciate the risks associated to future long-duration space missions and to develop pharmacologic or nutritional countermeasures allowing immune system protection, it is mandatory to fully understand how these cell types are affected by space conditions. Finally, we will compare immune changes observed in astronauts with those encountered in the elderly, thereby illustrating the societal interest of space research.

**Keywords:** space exploration, immunity, lymphocytes, stress, aging

## 1. Introduction

Since Yuri Gagarin became the first human to leave the Earth's confines in 1961, more and more humans have travelled into space and manned space stations have been built. During spaceflights, the organism is subjected to a variety of chronic and acute stressors. The first category comprises factors such as microgravity, confinement, isolation, radiation and disturbed circadian rhythm. The second category covers periods of intense activity, such as spacewalks, but also hypergravity exposure during take-off and landing. While acute stressors have been described as beneficial to the host as they can mobilize individual's defense capacities, several studies have shown that chronic stress have deleterious effects, as it contributes to the weakening of the immune system and the development of pathologies such as inflammatory disease, infections, and cancers [1-5]. In that context, it is interesting to note that 15 of the 29 astronauts involved in the Apollo missions developed bacterial or viral infections during, immediately after, or within a week of landing [6]. In addition, the very first epidemiological study based on medical data collected from 46 astronauts who spent 6 months on the ISS showed that 46% of them exhibited significant immunological problems [7]. Among notable events, 40% were classified as rashes/hypersensitivities and 27% as infectious

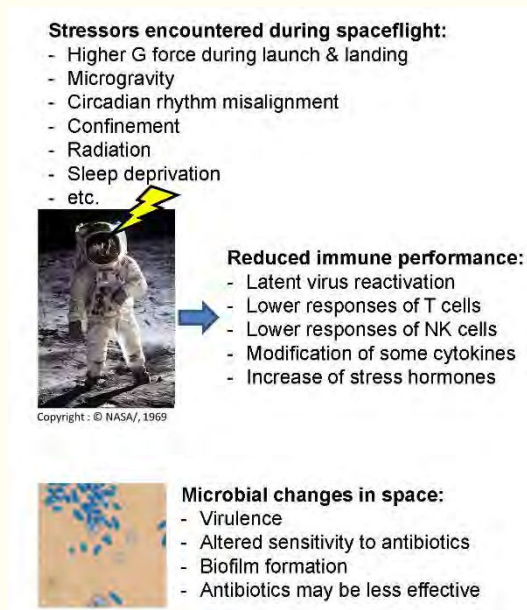




diseases. Taken together, these data show that spaceflight-associated stressors affect, on average, the immune system of one out of two astronauts. Furthermore, these data demonstrate that immune system dysregulation occurs not only after landing but also during the flight [7].

In parallel of this immunological weakening, it is important to keep in mind that changes in microbial growth and pathogenicity have been observed [8, 9]. Depending on the bacteria studied, increased or decreased virulence [10, 11], altered sensitivity to antibiotics [12, 13] and/or increased biofilm formation [11, 13, 14] have been described as a result of the modulation of gene expression [9–11, 15, 16]. Moreover, there is some evidence to suggest that antibiotics may be less effective in space [12, 17, 18].

These microbial changes, combined with dysregulation of the immune system, certainly contribute to explain the increased susceptibility to infections observed in astronauts [19] (**Figure 1**). It is also noteworthy to keep in mind that, as the duration of space missions will increase, the potential for infectious diseases to arise during flight may become a critical issue because the probability of cross-contamination between crewmembers will increase. Additionally, microbial mutation rates may increase. Solar and cosmic radiation met during space missions, with a cumulative dose obviously increasing with mission duration, could contribute to the appearance of mutations potentially associated to resistance or diseases during such long and stressful endeavor as interplanetary missions.



**Figure 1.**

*Environmental changes associated with spaceflight (stressors) such as gravity change, the perturbation of the circadian rhythm (every day the residents of the ISS witness 16 sunrises and 16 sunsets), confinement, increased radiation, sleep deprivation and nutritional factors weaken the immune system of about 50 % of the astronauts. Most frequent immune changes consist in viral reactivations and lower responses of T and NK (natural killer) cells. These changes could be due to changes in cytokine expression and increased levels of stress hormones. In parallel, spaceflight environment might increase the virulence, resistance and proliferation of some pathogens.*

Thus, caution should be paid to precisely understand how the immune system adapts, is modified/hampered, by unique environmental changes encountered during spaceflight. This knowledge is mandatory to allow the development of efficient biomedical strategies to preserve astronauts' health during prolonged deep space exploration missions. In this chapter, we will review how spatial conditions affect the maturation of immune cells as well as the functions of mature immune cells required for the effective protection of the individual.

## 2. Effects on the maturation of immune cells

Cells that make up our immune system derive from hematopoietic stem cells (HSC). These HSC will give rise to common myeloid progenitors (CMP) and common lymphoid progenitors (CLP). After several differentiation steps, CMPs will give rise to myeloid cells (granulocytes, monocytes, macrophages and dendritic cells) and CLPs to lymphoid cells (B and T lymphocytes and natural killer (NK) cells). All of these cells are involved in natural and/or specific immunity.

A number of studies have analyzed the impact of spaceflight on the development of cells belonging to the myeloid lineage (or myelopoiesis). A decrease in the number of granulocyte and monocyte progenitors in rodents that have been in space or subjected to anti-orthostatic suspension (a model commonly used in the laboratory to reproduce many of the physiological changes observed in flight) has been demonstrated [20, 21]. The culture of human CD34<sup>+</sup> progenitors in flight has confirmed the inhibitory effect of microgravity on erythropoiesis (red blood cell production) [22]. Other studies have shown that the stressors encountered during spaceflight impact lymphocyte development (or lymphopoiesis). Diverse animal models have been used to address this question, such as mouse or the Iberian ribbed newt (*Pleurodeles waltl*, a urodele amphibian). The latter lends itself well to the constraints associated with space experiments and has all the cardinal elements of the mammalian immune system [23]. It has notably been observed that *P. waltl* larvae developed on board the ISS exhibit changes in the expression of IgM heavy chain transcripts as well as a disruption in the expression of the Ikaros gene encoding transcription factors required for lymphopoiesis, suggesting that the latter could be weakened under spatial conditions [24]. This hypothesis was then confirmed in mice subjected to 21 days of anti-orthostatic suspension, which corresponds to a long-term mission at the human scale. It has been shown that this model induces a decrease in the number of CLPs and cells at the pro-B, pre-B, immature B and mature B stages in the femoral bone marrow of suspended mice compared to control mice [25]. Furthermore, various causes of this weakening have been identified, such as a decrease in signal transduction by the interleukin-7 receptor and a decrease in the expression of transcription factors essential for B cell development within the bone marrow. It has also been noted that this decrease in B lymphopoiesis is coupled with the remodeling of bone tissue induced by the suspension, thereby reminding that all physiological systems interact within an organism and that these interactions have to be taken into account when analyzing the impact of stressors such as modelled microgravity. Finally, this sensitivity of hematopoiesis and the link with bone remodeling, was confirmed in mice embarked on board the BION-M1 satellite for 30 days [26]. A decrease by a factor of two in the number of B lymphocytes present in the bone marrow and a statistically significant decrease in the expression of factors required for the development of immune and bone cells were observed 7 days after returning to Earth but not on landing (**Figure 2**). This time delay can be explained by the fact that bone loss worsens after landing [27].



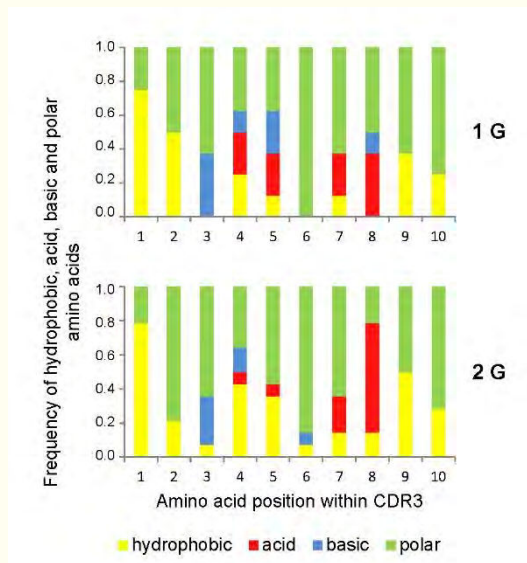


**Figure 2.**

*Analysis of femur from mice flown for 1 month on board the BION-M1 biosatellite revealed a decrease in the expression of 10 out of 11 proteins involved in immune cell and skeletal development, a decrease of the expression of 17 other immune-related proteins, and a 50% decrease in the number of B cells present in the bone marrow. Furthermore, this study showed that spaceflight effects were aggravated 1 week after landing [26]. Picture of mice in BION-M1 habitat from [28].*

Note that in addition to the explanations presented above, glucocorticoids produced in response to chronic stress may contribute to altering B lymphopoiesis. Indeed, it has been demonstrated that continuous administration of corticosterone, via a subcutaneous implant, induces reprogramming of lymphopoiesis in mice, with a reduction of 30 to 70% of pro-B, pre-B and immature B cells after 24 hours and a drop of 70 to 80% of pro-B and pre-B cells after 36 hours of treatment [29].

T-lymphopoiesis (T cell development in the thymus) is also affected by microgravity, as a decrease in T cells was observed in double positive (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) and single positive (CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) maturation stages, when murine fetal thymuses were cultivated under simulated microgravity or spatial conditions [30]. This observation can be explained, at least in part, by the high sensitivity of thymocytes to stress [31]. Indeed, significant changes in mRNA expression from genes known to regulate stress and glucocorticoid receptors were observed in the thymus of mice subjected to a 13-day flight [32]. Another study did analyze the impact on murine TCR of being conceived and born under increased G force (2 G). This study revealed a disruption in TCR (T cell antigen receptor) signaling and in the diversity of these receptor binding sites [33] (**Figure 3**) required for an individual to be able to specifically recognize peptides derived from the numerous antigens present in the environment; 85% of the TCR repertoire was different in 2 G pups compared to control pups. Thus, the diversity of T cell antigen receptor repertoire is significantly altered by 2 G exposure, which will likely affect host defense.



**Figure 3.**

*Exposure to hypergravity during pregnancy affects TCR binding sites thereby suggesting that the protection of the host might be affected [33]. T cells recognize an antigenic peptide on an MHC molecule at the surface of an antigen-presenting cell (dendritic cell, monocyte, macrophage, B cell). This recognition is ensured by the T cell receptor (TCR) whose binding site is composed of 6 small polypeptide loops: 2 CDR1 loops, 2 CDR2 loops and 2 CDR3 loops. CDR1 and CDR2 loops bind the MHC molecule. CDR3 loops bind the peptide. This figure presents the frequency of hydrophobic, acid, basic and polar amino acids at each position within TCR CDR3 loops from murine pups conceived and born at 1 or 2 G.*

The impact of a model aiming at mimicking socio-environmental stresses experienced by astronauts [34] was then studied. This model involves the chronic exposure of mice to unpredictable socio-environmental stresses of various types (e.g. confinement, isolation, cage tilt, paired housing, perturbed circadian rhythm) and moderate intensity. It was demonstrated that this type of stressors only modifies 25% of the TCR repertoire [35]. Consequently, it appears that a change in the gravitational force has a much greater impact than socio-environmental stresses on the T cell antigen receptor repertoire.

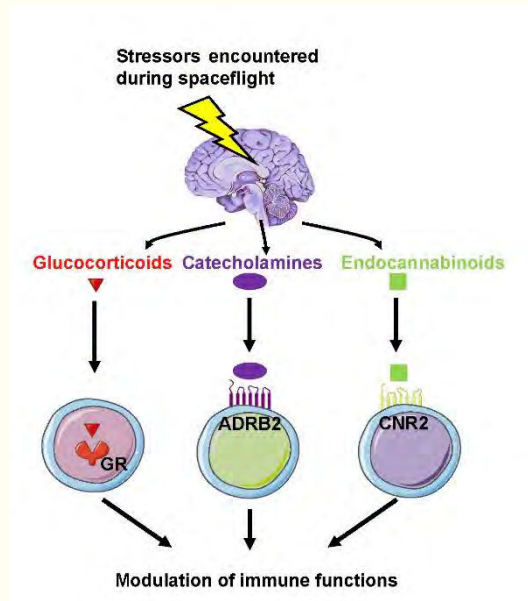
### 3. Effects on phagocytic and NK cells

Natural or innate immunity is body's first line of defense against a pathogen after the skin and epithelial surfaces. It enables a non-specific response to be implemented, involving various types of immune cells such as neutrophils, monocytes and macrophages to destroy pathogens by phagocytosis and the release of microbicide substances.

Several studies have been conducted to understand how the space environment affects this immunity. For instance, an increase in the level of blood neutrophils in both humans and animals has often been observed after landing, and can be attributed to the stresses encountered during this phase. Indeed, stress can induce the mobilization of these cells stored in the bone marrow [36, 37]. However, other explanations are also possible, such as changes in the expression of adhesion molecules [38]. It has also been shown that spatial conditions decrease the phagocytic and oxidative functions of neutrophils [39, 40] and induce, in monocytes,



dysregulation in cytokine production, a reduced capacity to engulf *Escherichia coli* as well as lower reactive oxygen species (ROS) production and degranulation [41, 42]. Lower cytotoxicity of natural killer cells, that provide immunological resistance and defense against foreign microorganisms but also against cells transformed because of, for example, a viral infection was observed [43, 44]. In addition, the reactivation of latent herpes viruses has frequently been reported. For example, Varicella-zoster virus (VZV) DNA has been detected in the saliva of astronauts during and immediately after a flight, while no VZV DNA was detected before launch [45]. Additional studies have revealed the presence of VZV in the saliva of 50% of astronauts during short spaceflights [46] and have shown that this percentage can increase up to 65% during long-duration missions [47]. Significantly, a few cases resulted in the development of shingles [45]. These viral reactivations are frequently coupled with a decrease in the production of interferons (cytokines constituting a first response in the event of viral infection) and to a higher level of stress hormones known to be able to regulate immune functions. Indeed, a variety of immune cells express glucocorticoid receptors, cannabinoid receptors and adrenergic receptors (**Figure 4**). Thus, molecules produced in response to stressing events can directly affect immune cells and can be responsible of the reactivation of latent viruses [48–53].



**Figure 4.**

*Stressors encountered during space missions can induce the production of glucocorticoids, catecholamine and endocannabinoids. Numerous immune cell types have receptors for these molecules. Their functions can therefore be directly affected by the binding of these molecules on these receptors. GR, glucocorticoid receptor. ADRB2, beta-2 adrenergic receptor. CNR2, cannabinoid receptor type 2.*

Furthermore, virus reactivation could be a good biomarker of immunity weakening [54]. In support of this neuro-modulation of the immune system, studies conducted on humans subjected to acute (parabolic flight), medium (1 to 2 weeks on board the ISS) or long (4 to 7 months on board the ISS) duration gravitational stress demonstrated that there is a shift from an alert state of natural immune cells after acute gravitational stress to a decrease of their activity after spaceflight [55–57]. These changes were associated with changes in stress response, with a



predominance of sympathetic nervous system responses after short flights, whereas long flights were characterized by glucocorticoid-induced changes. These data demonstrate that beside gravity change, stress responses are an important contributor to spaceflight-associated immune changes and once again highlight the importance of taking into account interconnections between physiological systems (here the nervous and immune systems).

#### 4. Effects on antigen-presenting cells and lymphocytes

Specific or adaptive immunity is the second line of defense against the entry of foreign substances, particles or cells into the organism. It involves natural and specific immune cells (Antigen-presenting cells (APC) and lymphocytes) that will cooperate to develop a response specifically directed against the intruder.

Antigen-presenting cells (APCs) are a heterogeneous group that treat and present antigens in the form of peptides to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes unable to recognize a native antigen *via* their TCR. These cells are crucial in triggering an immune response. This group includes dendritic cells, monocytes/macrophages and B lymphocytes.

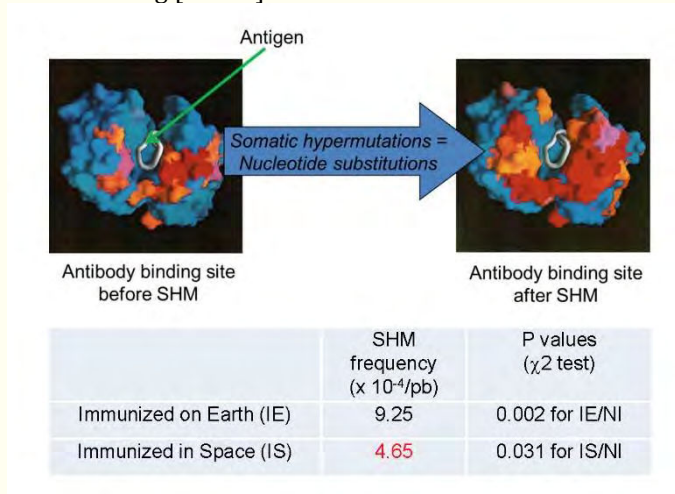
Even though the antigen presentation function is an essential immune process, very little information is available on the impact that environmental conditions encountered during spaceflights could have on this function. Only one study has been published on dendritic cells and revealed that microgravity reduces their production, their phagocytic capacities, and the surface expression of costimulatory/adhesion molecules involved in the presentation of antigenic peptides [58]. These data suggest that certain functions of antigen-presenting cells, required for the development of an effective immune response, may be disrupted in microgravity.

On the other hand, numerous studies have shown a significant reduction in T cell activity under both real and simulated microgravity. This lower activity [59] results from spaceflight-induced modifications of the expression of genes essential for the proper functioning of T cells such as those encoding interleukin 2 and its receptor [60], translation of mRNAs [61], cell-cell interactions [62], alterations of the structure of the cytoskeleton [63–66], signal transduction enabling T cell activation [67–69] and cell cycle regulation [70].

B lymphocytes is another cell type that acts in synergy with T lymphocytes to ensure optimal protection of the individual. These cells, at the maturation stage called plasmocyte, produce large quantities of antibodies, which, by binding specifically to the antigen, contribute to its elimination. Antibodies and B lymphocytes constitute humoral immunity whose modulation by spatial conditions has been much less studied than that of T lymphocytes. For many years, researchers have been satisfied with the quantification of antibodies present in the serum/plasma of astronauts but these studies generated conflicting results. For example, Konstantinova et al [71] reported increased levels of serum IgA and IgM while Rykova et al [40] indicated that the amounts of serum IgA, IgG and IgM were not affected after prolonged space missions. Subsequently, further studies were conducted to determine how changes in gravity affect humoral immunity and demonstrated that stresses encountered during spaceflight quantitatively and qualitatively affect the production of antibodies in response to antigenic stimulation. Changes in the expression of VH gene segments, encoding a large part of the antibody binding sites, have been observed in adult *P. waltl* immunized on board the Mir space station [72, 73] as well as a two-fold decrease in the frequency of somatic hypermutations that enable the diversification of antibody binding sites, in order to improve their affinity for the antigen [74] (**Figure 5**). Very recently, changes in the



use of the gene segments required to create the antibody repertoire have also been observed in immunized mice subjected to anti-orthostatic suspension [75]. The antibody repertoire is therefore most likely modified under either real or simulated microgravity. In addition, a decrease in the expression of several effectors involved in immunity was observed 7 days after landing in mice that had been on board the BION-M1 biosatellite for 30 days [26]. This observation confirms the negative effect of spaceflight on the immune system and demonstrates that this impairment persists for at least 7 days after the return to Earth. This conclusion is in line with the studies that revealed disruptions in the production of antibodies in *P. waltl* still visible 10 days after landing [72–74].



**Figure 5.**

*Somatic hypermutations (SHM) are nucleotide substitutions whose purpose is to improve the affinity of antibody binding sites. The frequency of these mutations was determined in adult *P. waltl* immunized on board the Mir space station and in adult *P. waltl* immunized with the same antigen on Earth. This study showed that the frequency of these mutations is two times lower when animals are immunized on board the space station [74]. IE, *P. waltl* immunized on Earth. IS, *P. waltl* immunized in space. NI, not immunized.*

Finally, it has been shown that the proliferative responses of B and T lymphocytes are reduced when mice are subjected to gravity changes (anti-orthostatic suspension or 2 G hypergravity) for three weeks [76, 77]. However, the responses from these lymphocytes were not altered after three weeks of exposure to the model mimicking socio-environmental stressors encountered in flight [34]. These data suggest that the lower reactivity in lymphocytes induced by spaceflight is mainly due to gravity change.

Note that there is a break in the adaptation of mice at 3 G, which results in an increase in the serum corticosterone concentration and the level of anxiety [76]. These changes persist beyond two weeks after the return to normal gravity. This demonstrates that the hypergravity model should be used with caution if the effects of hypergravity are to be distinguished from those of a stress response. From 3 G, these two variables are cumulative.

## 5. Spaceflight as a model of accelerated immunosenescence?

Certain immunological changes observed in astronauts or rodents on space missions can also be found in the elderly. For example, thymus involution, increased



susceptibility to infections and decreased response to vaccines may be correlated with impaired development of B and T lymphocyte function in the elderly [78, 79]. This thymus involution and changes in the development and response of immune cells are also observed when the gravitational force is altered, as illustrated by the reactivation of latent viruses in astronauts and the elderly. In addition, a recent study suggests that long-term spaceflight could induce an increase in inflammation as in the elderly ('inflammaging'), which could increase the risk of allergies or autoimmune diseases in astronauts [80]. Finally, aging is accompanied by changes in antibody production similar to those observed in flight. There is a decrease in antibody affinity [78] and a change in the use of antibody VH gene segments [81] as observed in *P. waltl* immunized in flight [73, 74], which affects the diversity of the antibody repertoire. It therefore appears that stresses encountered during space missions could lead to premature aging of the immune system.

## Conclusion and perspectives

Studies conducted so far, show that on average one out of two astronauts encounters immunological problems and that stressors encountered during spaceflights can affect all components of the immune system. It is therefore mandatory to understand in details how all immune cell types are affected by space conditions by unravelling the cellular and molecular mechanisms modified within these cells. Indeed, the impact of spatial conditions on certain cells and functions of the immune system have not yet been precisely determined. Furthermore, the impact of long-term missions is largely under-investigated. This is because, up to now, most scientific data are derived from space missions not exceeding six months in duration. In addition, the impact of spatial conditions on interconnections between the immune and other systems (such as the musculoskeletal, nervous, respiratory and cardiovascular systems) should be studied using interdisciplinary approaches. All this knowledge is required *i)* to gain a better understanding of the risks incurred during future long-duration space missions (such as planned mission to Mars), where the crew will be left to their own with no possibility of a rapid return to Earth, and *ii)* to develop nutritional, psychosocial and/or pharmacological countermeasures to reduce stress, preserve the immune system and prevent the development or aggravation of diseases [82]. Another aspect that should be taken into account is in flight monitoring of astronaut's health and diagnostic data using miniature and autonomous biosensors to help establishing personalized treatments. This corresponds to a new field of research, space biotechnology, which aims to use advanced techniques ("omics" techniques) for the quantitative detection of proteins, nucleic acids and metabolites *in situ* [83–86]. Such biosensors capable of analyzing minimum quantities of body fluids and of generating semi-quantitative or quantitative results in a few minutes and with minimal resource consumption in terms of weight, volume, reagent storage and energy consumption will be required to allow deep space exploration. These researches and technological developments could also improve health on Earth as they could lead to new therapeutic strategies to treat age- and stress-related immunosuppression and could likely contribute to improve point-of-care diagnostics at a patient's bedside, in a doctor's office or hospital.

## Acknowledgments





The authors acknowledge support by the European Space Agency, the French National Space Agency (CNES), the French Ministry of Higher Education and Research, the Université de Lorraine, the Région Lorraine, the Communauté Urbaine du Grand Nancy and the European Regional Development Fund.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- [1] Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behavior, and Immunity*. 1997;11:286–306. DOI: [10.1006/brbi.1997.0508](https://doi.org/10.1006/brbi.1997.0508)
- [2] Silberman DM, Wald MR, Genaro AM. Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *Journal of Neuroimmunology*. 2003;144:53–60. DOI: [10.1016/j.jneuroim.2003.08.031](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.08.031)
- [3] Godbout JP, Glaser R. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *Journal of NeuroImmune Pharmacology*. 2006;1:421–427. DOI: [10.1007/s11481-006-9036-0](https://doi.org/10.1007/s11481-006-9036-0)
- [4] Webster Marketon JI, Glaser R. Stress hormones and immune function. *Cellular Immunology*. 2008;252:16–26. DOI: [10.1016/j.cellimm.2007.09.006](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.09.006)
- [5] Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16:300–317. DOI: [10.1159/000216188](https://doi.org/10.1159/000216188)
- [6] Kimzey S. Hematology and immunology studies. In: Johnson RS, Dietlein LF, editors. *Biomedical Results from Skylab*. NASA, Washington DC; 1977. p. 248–282.
- [7] Crucian B, Babiak-Vazquez A, Johnston S, Pierson DL, Ott CM, Sams C. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *International Journal of General Medicine*. 2016;9:383–391. DOI: [10.2147/IJGM.S114188](https://doi.org/10.2147/IJGM.S114188)
- [8] Horneck G, Klaus DM, Mancinelli RL. Space microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010;74:121–156. DOI: [10.1128/MMBR.00016-09](https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-09)
- [9] Zea L, Prasad N, Levy SE, Stodieck L, Jones A, Shrestha S, et al. A Molecular Genetic Basis Explaining Altered Bacterial Behavior in Space. *PloS One*. 2016;11:e0164359. DOI: [10.1371/journal.pone.0164359](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164359)
- [10] Rosenzweig JA, Ahmed S, Eunson J, Chopra AK. Low-shear force associated with modeled microgravity and spaceflight does not similarly impact the virulence of notable bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98:8797–8807. DOI: [10.1007/s00253-014-6025-8](https://doi.org/10.1007/s00253-014-6025-8)
- [11] Cervantes JL, Hong B-Y. Dysbiosis and Immune Dysregulation in Outer Space. *International Reviews in Immunology*. 2016;35(1):67–82. DOI: [10.3109/08830185.2015.1027821](https://doi.org/10.3109/08830185.2015.1027821)
- [12] Klaus DM, Howard HN. Antibiotic efficacy and microbial virulence during space flight. *Trends in Biotechnology*. 2006;24:131–136. DOI: [10.1016/j.tibtech.2006.01.008](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.01.008)
- [13] Lynch SV, Mukundakrishnan K, Benoit MR, Ayyaswamy PS, Matin A. *Escherichia coli* biofilms formed under low-shear modeled microgravity in a ground-based system. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72:7701–7710. DOI: [10.1128/AEM.01294-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01294-06)



- [14] Kim H, Bhunia AK. Secreted *Listeria* adhesion protein (Lap) influences Lap-mediated *Listeria monocytogenes* paracellular translocation through epithelial barrier. *Gut Pathogens*. 2013;5:16. DOI: [10.1186/1757-4749-5-16](https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-16)
- [15] Crabbé A, Schurr MJ, Monsieurs P, Morici L, Schurr J, Wilson JW, et al. Transcriptional and proteomic responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to spaceflight conditions involve Hfq regulation and reveal a role for oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77:1221–1230. DOI: [10.1128/AEM.01582-10](https://doi.org/10.1128/AEM.01582-10)
- [16] Shi J, Wang Y, He J, Li P, Jin R, Wang K, et al. Intestinal microbiota contributes to colonic epithelial changes in simulated microgravity mouse model. *FASEB Journal*. 2017;31:3695–3709. DOI: [10.1096/fj.201700034R](https://doi.org/10.1096/fj.201700034R)
- [17] Juergensmeyer MA, Juergensmeyer EA, Guikema JA. Long-term exposure to spaceflight conditions affects bacterial response to antibiotics. *Microgravity Science and Technology*. 1999;12:41–47. PMID: 11543359
- [18] Taylor PW, Sommer AP. Towards rational treatment of bacterial infections during extended space travel. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005;26:183–187. DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2005.06.002](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.06.002)
- [19] Frippiat J-P, Crucian BE, de Quervain DJ-F, 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](https://doi.org/10.1038/npjmgrav.2016.40)
- [20] Dunn CD, Johnson PC, Lange RD, Perez L, Nessel R. Regulation of hematopoiesis in rats exposed to antiorthostatic, hypokinetic/hypodynamia: I. Model description. *Aviation, Space and Environmental Medicine*. 1985;56:419–426. PMID: 4004676
- [21] Ichiki AT, Gibson LA, Jago TL, Strickland KM, Johnson DL, Lange RD, et al. Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996;60:37–43. DOI: [10.1002/jlb.60.1.37](https://doi.org/10.1002/jlb.60.1.37)
- [22] Davis TA, Wiesmann W, Kidwell W, Cannon T, Kerns L, Serke C, et al. Effect of spaceflight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myelopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996;60:69–76. DOI: [10.1002/jlb.60.1.69](https://doi.org/10.1002/jlb.60.1.69)
- [23] Frippiat J-P. Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. *Molecular Immunology*. 2013;56:434–441. DOI: [10.1016/j.molimm.2013.06.011](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.06.011)
- [24] 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 Journal*. 2013;27:333–341. DOI: [10.1096/fj.12-217547](https://doi.org/10.1096/fj.12-217547)
- [25] 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 Journal*. 2015;29:455–463. DOI: [10.1096/fj.14-259770](https://doi.org/10.1096/fj.14-259770)
- [26] Tascher G, Gerbaix M, Maes P, Chazarin B, Ghislin S, Antropova E, et al. Analysis of femurs from mice embarked on board BION-M1 biosatellite reveals a decrease in immune cell development, including B cells, after 1 wk of recovery on Earth. *FASEB Journal*. 2019;33:3772–3783. DOI: [10.1096/fj.201801463R](https://doi.org/10.1096/fj.201801463R)
- [27] Gerbaix M, White H, Courbon G, Shenkman B, Gauquelin-Koch G, Vico L. Eight Days of Earth Reambulation Worsen Bone Loss Induced by 1-Month Spaceflight in the Major Weight-Bearing Ankle Bones of Mature Mice. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:746. DOI: [10.3389/fphys.2018.00746](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00746)



- [28] 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](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104830).
- [29] Laakko T, Fraker P. Rapid changes in the lymphopoietic and granulopoietic compartments of the marrow caused by stress levels of corticosterone. *Immunology*. 2002;105:111–119. DOI: [10.1046/j.1365-2567.2002.01346.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01346.x)
- [30] Woods CC, Banks KE, Gruener R, DeLuca D. Loss of T cell precursors after spaceflight and exposure to vector-averaged gravity. *FASEB Journal*. 2003;17:1526–1528. DOI: [10.1096/fj.02-0749fje](https://doi.org/10.1096/fj.02-0749fje)
- [31] Taves MD, Hamden JE, Soma KK. Local glucocorticoid production in lymphoid organs of mice and birds: Functions in lymphocyte development. *Hormones and Behavior*. 2017;88:4–14. DOI: [10.1016/j.yhbeh.2016.10.022](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.10.022)
- [32] Lebsack TW, Fa V, Woods CC, Gruener R, Manziello AM, Pecaut MJ, et al. Microarray analysis of spaceflown murine thymus tissue reveals changes in gene expression regulating stress and glucocorticoid receptors. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010;110:372–381. DOI: [10.1002/jcb.22547](https://doi.org/10.1002/jcb.22547)
- [33] Ghislin S, Ouzren-Zarhloul N, Kaminski S, Fripiat J-P. Hypergravity exposure during gestation modifies the TCR $\beta$  repertoire of newborn mice. *Scientific Reports*. 2015;5:9318. DOI: [10.1038/srep09318](https://doi.org/10.1038/srep09318)
- [34] Gaignier F, Legrand-Frossi C, Stragier E, Mathiot J, Merlin J-L, Cohen-Salmon C, et al. A Model of Chronic Exposure to Unpredictable Mild Socio-Environmental Stressors Replicates Some Spaceflight-Induced Immunological Changes. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:514. DOI: [10.3389/fphys.2018.00514](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00514)
- [35] Fonte C, Kaminski S, Vanet A, Lanfumey L, Cohen-Salmon C, Ghislin S, et al. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR- $\beta$  repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB Journal*. 2019;33:896–908. DOI: [10.1096/fj.201800969R](https://doi.org/10.1096/fj.201800969R)
- [36] Michurina TV, Domaratskaya EI, Nikonova TM, Khrushchov NG. Blood and clonogenic hemopoietic cells of newts after the space flight. *Advances in Space Research*. 1996;17:295–298. DOI: [10.1016/0273-1177\(95\)00650-4](https://doi.org/10.1016/0273-1177(95)00650-4)
- [37] Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, Bueb J-L, Tschirhart E, Legrand-Frossi C, et al. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *Journal of Leukocyte Biology*. 2009;86:1027–1038. DOI: [10.1189/jlb.0309167](https://doi.org/10.1189/jlb.0309167)
- [38] Stowe RP, Sams CF, Mehta SK, Kaur I, Jones ML, Feedback DL, et al. Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *Journal of Leukocyte Biology*. 1999;65:179–186. DOI: [10.1002/jlb.65.2.179](https://doi.org/10.1002/jlb.65.2.179)
- [39] Kaur I, Simons ER, Castro VA, Mark Ott C, Pierson DL. Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain, Behaviour, and Immunity*. 2004;18:443–450. DOI: [10.1016/j.bbi.2003.10.005](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2003.10.005)
- [40] Rykova MP, Antropova EN, Larina IM, Morukov BV. Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. *Acta Astronautica*. 2008;63:697–705. DOI: [10.1016/j.actaastro.2008.03.016](https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2008.03.016)
- [41] Crucian B, Stowe R, Quiarte H, Pierson D, Sams C. Monocyte phenotype and cytokine production profiles are dysregulated by short-duration spaceflight. *Aviation, Space and Environmental Medicine*. 2011;82:857–862. DOI: [10.3357/ASEM.3047.2011](https://doi.org/10.3357/ASEM.3047.2011)
- [42] Kaur I, Simons ER, Kapadia AS, Ott CM, Pierson DL. Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008;15:1523–1528. DOI: [10.1128/CVI.00065-08](https://doi.org/10.1128/CVI.00065-08)
- [43] Meshkov D, Rykova M. The natural cytotoxicity in cosmonauts on board space stations. *Acta Astronautica*. 1995;36:719–726. DOI: [10.1016/0094-5765\(95\)00162-X](https://doi.org/10.1016/0094-5765(95)00162-X)



- [44] Taylor GR, Janney RP. In vivo testing confirms a blunting of the human cell-mediated immune mechanism during space flight. *Journal of Leukocyte Biology*. 1992;51:129–132. DOI: [10.1002/jlb.51.2.129](https://doi.org/10.1002/jlb.51.2.129)
- [45] Mehta SK, Cohrs RJ, Forghani B, Zerbe G, Gilden DH, Pierson DL. Stress-induced subclinical reactivation of varicella zoster virus in astronauts. *Journal of Medical Virology*. 2004;72:174–179. DOI: [10.1002/jmv.10555](https://doi.org/10.1002/jmv.10555)
- [46] Mehta SK, Laudenslager ML, Stowe RP, Crucian BE, Sams CF, Pierson DL. Multiple latent viruses reactivate in astronauts during Space Shuttle missions. *Brain, Behaviour, and Immunity*. 2014;41:210–217. DOI: [10.1016/j.bbi.2014.05.014](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.05.014)
- [47] Mehta SK, Laudenslager ML, Stowe RP, Crucian BE, Feiveson AH, Sams CF, et al. Latent virus reactivation in astronauts on the international space station. *NPJ Microgravity*. 2017;3:11. DOI: [10.1038/s41526-017-0015-y](https://doi.org/10.1038/s41526-017-0015-y)
- [48] Meehan R, Whitson P, Sams C. The role of psychoneuroendocrine factors on spaceflight-induced immunological alterations. *Journal of Leukocyte Biology*. 1993;54:236–244. DOI: [10.1002/jlb.54.3.236](https://doi.org/10.1002/jlb.54.3.236)
- [49] Crucian BE, Cabbage ML, Sams CF. Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2000;20:547–556. DOI: [10.1089/10799900050044741](https://doi.org/10.1089/10799900050044741)
- [50] Mehta SK, Stowe RP, Feiveson AH, Tyring SK, Pierson DL. Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. *Journal of Infectious Diseases*. 2000;182:1761–1764. DOI: [10.1086/317624](https://doi.org/10.1086/317624)
- [51] Stowe RP, Mehta SK, Ferrando AA, Feeback DL, Pierson DL. Immune responses and latent herpesvirus reactivation in spaceflight. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*. 2001;72:884–891. PMID: 11601551
- [52] Stowe RP, Pierson DL, Barrett AD. Elevated stress hormone levels relate to Epstein-Barr virus reactivation in astronauts. *Psychosomatic Medicine*. 2001;63:891–895. DOI: [10.1097/00006842-200111000-00007](https://doi.org/10.1097/00006842-200111000-00007)
- [53] Mehta SK, Crucian BE, Stowe RP, Simpson RJ, Ott CM, Sams CF, et al. Reactivation of latent viruses is associated with increased plasma cytokines in astronauts. *Cytokine*. 2013;61:205–209. DOI: [10.1016/j.cyto.2012.09.019](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.09.019)
- [54] Cohrs RJ, Mehta SK, Schmid DS, Gilden DH, Pierson DL. Asymptomatic reactivation and shed of infectious varicella zoster virus in astronauts. *Journal of Medical Virology*. 2008;80:1116–1122. DOI: [10.1002/jmv.21173](https://doi.org/10.1002/jmv.21173)
- [55] Stowe RP, Sams CF, Pierson DL. Effects of mission duration on neuroimmune responses in astronauts. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*. 2003;74:1281–1284. PMID: 14692473
- [56] Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*. 2008;79:835–843. DOI: [10.3357/ASEM.2276.2008](https://doi.org/10.3357/ASEM.2276.2008)
- [57] Kaufmann I, Schachtner T, Feuerecker M, Schelling G, Thiel M, Choukèr A. Parabolic flight primes cytotoxic capabilities of polymorphonuclear leucocytes in humans. *European Journal of Clinical Investigation*. 2009;39:723–728. DOI: [10.1111/j.1365-2362.2009.02136.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02136.x)
- [58] Savary CA, Graziuti ML, Przepiorka D, Tomasovic SP, McIntyre BW, Woodside DG, et al. Characteristics of human dendritic cells generated in a microgravity analog culture system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 2001;37:216–222. DOI: [10.1007/BF02577532](https://doi.org/10.1007/BF02577532)
- [59] Cogoli A, Tschopp A, Fuchs-Bislin P. Cell sensitivity to gravity. *Science*. 1984;225:228–230. DOI: [10.1126/science.6729481](https://doi.org/10.1126/science.6729481)
- [60] Walther I, Pippia P, Meloni MA, Turrini F, Mannu F, Cogoli A. Simulated microgravity inhibits the genetic expression of interleukin-2 and its receptor in mitogen-activated T lymphocytes. *FEBS Letters*. 1998;436:115–118. DOI: [10.1016/s0014-5793\(98\)01107-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01107-7)



- [61] Hughes-Fulford M, Chang TT, Martinez EM, Li C-F. Spaceflight alters expression of microRNA during T-cell activation. *FASEB Journal*. 2015;29:4893–4900. DOI: [10.1096/fj.15-277392](https://doi.org/10.1096/fj.15-277392)
- [62] Cogoli-Greuter M, Meloni MA, Sciola L, Spano A, Pippia P, Monaco G, et al. Movements and interactions of leukocytes in microgravity. *Journal of Biotechnology*. 1996;47:279–287. DOI: [10.1016/0168-1656\(96\)01380-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01380-6)
- [63] Lewis ML, Reynolds JL, Cubano LA, Hatton JP, Lawless BD, Piepmeier EH. Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB Journal*. 1998;12:1007–1018. DOI: [10.1096/fasebj.12.11.1007](https://doi.org/10.1096/fasebj.12.11.1007)
- [64] Cogoli-Greuter M. Effect of gravity changes on the cytoskeleton in human lymphocytes. *Gravitational and Space Biology Bulletin*. 2004;17:27–37.
- [65] Meloni MA, Galleri G, Pippia P, Cogoli-Greuter M. Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modelled low gravity. *Protoplasma*. 2006;229:243–249. DOI: [10.1007/s00709-006-0210-2](https://doi.org/10.1007/s00709-006-0210-2)
- [66] Meloni MA, Galleri G, Pani G, Saba A, Pippia P, Cogoli-Greuter M. Space flight affects motility and cytoskeletal structures in human monocyte cell line J-111. *Cytoskeleton*. 2011;68:125–137. DOI: [10.1002/cm.20499](https://doi.org/10.1002/cm.20499)
- [67] Boonyaratanakornkit JB, Cogoli A, Li C-F, Schopper T, Pippia P, Galleri G, et al. Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB Journal*. 2005;19:2020–2022. DOI: [10.1096/fj.05-3778fje](https://doi.org/10.1096/fj.05-3778fje)
- [68] Chang TT, Walther I, Li C-F, Boonyaratanakornkit J, Galleri G, Meloni MA, et al. The Rel/NF- $\kappa$ B pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;92:1133–1145. DOI: [10.1189/jlb.0312157](https://doi.org/10.1189/jlb.0312157)
- [69] Martinez EM, Yoshida MC, Candelario TLT, Hughes-Fulford M. Spaceflight and simulated microgravity cause a significant reduction of key gene expression in early T-cell activation. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2015;308:R480–488. DOI: [10.1152/ajpregu.00449.2014](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00449.2014)
- [70] Thiel CS, Paulsen K, Bradacs G, Lust K, Tauber S, Dumrese C, et al. Rapid alterations of cell cycle control proteins in human T lymphocytes in microgravity. *Cell Communication and Signaling*. 2012;10:1. DOI: [10.1186/1478-811X-10-1](https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-1)
- [71] Konstantinova IV, Rykova MP, Lesnyak AT, Antropova EA. Immune changes during long-duration missions. *Journal of Leukocyte Biology*. 1993;54:189–201. DOI: [10.1002/jlb.54.3.189](https://doi.org/10.1002/jlb.54.3.189)
- [72] Boxio R, Dournon C, Frippiat J-P. Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Journal of Applied Physiology*. 2005;98:905–910. DOI: [10.1152/jappphysiol.00957.2004](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00957.2004)
- [73] Bascove M, Huin-Schohn C, Guéguinou N, Tschirhart E, Frippiat J-P. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB Journal*. 2009;23:1607–1615. DOI: [10.1096/fj.08-121327](https://doi.org/10.1096/fj.08-121327)
- [74] Bascove M, Guéguinou N, Schaerlinger B, Gauquelin-Koch G, Frippiat J-P. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB Journal*. 2011;25:2947–2955. DOI: [10.1096/fj.11-185215](https://doi.org/10.1096/fj.11-185215)
- [75] Rettig TA, Bye BA, Nishiyama NC, Hlavacek S, Ward C, Pecaut MJ, et al. Effects of skeletal unloading on the antibody repertoire of tetanus toxoid and/or CpG treated C57BL/6J mice. *PloS One*. 2019;14:e0210284. DOI: [10.1371/journal.pone.0210284](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210284)
- [76] 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;37:137–147. DOI: [10.1016/j.psyneuen.2011.05.015](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.05.015)





- [77] Gaignier F, Schenten V, De Carvalho Bittencourt M, Gauquelin-Koch G, Frippiat J-P, 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](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092664)
- [78] Sasaki S, Sullivan M, Narvaez CF, Holmes TH, Furman D, Zheng N-Y, et al. Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121:3109–3119. DOI: [10.1172/JCI57834](https://doi.org/10.1172/JCI57834)
- [79] Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13:875–887. DOI: [10.1038/nri3547](https://doi.org/10.1038/nri3547)
- [80] Buchheim J-I, Matzel S, Rykova M, Vassilieva G, Ponomarev S, Nichiporuk I, et al. Stress Related Shift Toward Inflammaging in Cosmonauts After Long-Duration Space Flight. *Frontiers in Physiology*. 2019;10:85. DOI: [10.3389/fphys.2019.00085](https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00085)
- [81] Gibson KL, Wu Y-C, 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](https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00443.x)
- [82] Crucian BE, Choukèr A, Simpson RJ, Mehta S, Marshall G, Smith SM, et al. Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1437. DOI: [10.3389/fimmu.2018.01437](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01437)
- [83] Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, Stahl SE, Rubins KH, McIntyre ABR, et al. Nanopore DNA Sequencing and Genome Assembly on the International Space Station. *Scientific Reports*. 2017;7:18022. DOI: [10.1038/s41598-017-18364-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-18364-0)
- [84] Karouia F, Peyvan K, Pohorille A. Toward biotechnology in space: High-throughput instruments for in situ biological research beyond Earth. *Biotechnology Advances*. 2017;35:905–932. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2017.04.003](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.04.003)
- [85] Roda A, Mirasoli M, Guardigli M, Zangheri M, Caliceti C, Calabria D, et al. Advanced biosensors for monitoring astronauts' health during long-duration space missions. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;111:18–26. DOI: [10.1016/j.bios.2018.03.062](https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.062)
- [86] Zangheri M, Mirasoli M, Guardigli M, Di Nardo F, Anfossi L, Baggiani C, et al. Chemiluminescence-based biosensor for monitoring astronauts' health status during space missions: Results from the International Space Station. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019;129:260–268. DOI: [10.1016/j.bios.2018.09.059](https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.059)





## Références

---





## IV. Références

1. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:593–623.
2. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 2008 Aug 15;112(4):935–45.
3. Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev.* 2016;273(1):11–28.
4. Keshav S, Chung P, Milon G, Gordon S. Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization. *J Exp Med.* 1991 Nov 1;174(5):1049–58.
5. Lappin D, Hamilton AD, Morrison L, Aref M, Whaley K. Synthesis of complement components (C3, C2, B and C1-inhibitor) and lysozyme by human monocytes and macrophages. *J Clin Lab Immunol.* 1986 Jul;20(3):101–5.
6. Cline MJ, Hanifin J, Lehrer RI. Phagocytosis by human eosinophils. *Blood.* 1968 Dec;32(6):922–34.
7. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev.* 2007 Oct;219:143–56.
8. Saeed S, Quintin J, Kerstens HHD, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science.* 2014 Sep 26;345(6204):1251086.
9. Schattner A, Rager-Zisman B. Lysis by natural killer cells requires viral replication and glycoprotein expression. *Immunol Lett.* 1986 Oct 15;13(5):261–8.
10. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett.* 2005 Aug 15;100(1):7–13.
11. Chovatiya R, Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell.* 2014 Apr 24;54(2):281–8.
12. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:229–65.
13. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006 Mar 9;440(7081):228–32.
14. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):404–10.
15. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 1986 Feb 20;319(6055):675–8.

16. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):361–7.
17. Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:131–55.
18. Pecchi E, Dallaporta M, Jean A, Thirion S, Troadec J-D. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiol Behav*. 2009 Jun 22;97(3-4):279–92.
19. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999 Feb 11;340(6):448–54.
20. Thomas CJ, Schroder K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol*. 2013 Jul;34(7):317–28.
21. Barchet W, Cella M, Odermatt B, Asselin-Paturel C, Colonna M, Kalinke U. Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J Exp Med*. 2002 Feb 18;195(4):507–16.
22. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol*. 2001 Dec;2(12):1144–50.
23. Asselin-Paturel C, Brizard G, Chemin K, Boonstra A, O’Garra A, Vicari A, et al. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med*. 2005 Apr 4;201(7):1157–67.
24. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563–604.
25. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010 Feb 5;327(5966):656–61.
26. Hazlett L, Wu M. Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan;343(1):175–88.
27. Ragland SA, Criss AK. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog*. 2017 Sep;13(9):e1006512.
28. Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Br Med J*. 1972 Jan 8;1(5792):69–75.
29. Arnold RR, Cole MF, McGhee JR. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*. 1977 Jul 15;197(4300):263–5.
30. Rosa L, Cutone A, Lepanto MS, Paesano R, Valenti P. Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Sep 15;18(9).
31. Jensen H, Hancock REW. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*. 2009 Jan;91(1):19–29.
32. Tomlinson S. Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol*. 1993 Feb;5(1):83–9.

33. Grossberger D, Marcuz A, Du Pasquier L, Lambris JD. Conservation of structural and functional domains in complement component C3 of *Xenopus* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Feb;86(4):1323–7.
34. Avila D, Lambris JD. Isolation and characterization of the third complement component of axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Comp Biochem Physiol B*. 1990;95(4):839–45.
35. Pangburn MK, Ferreira VP, Cortes C. Discrimination between host and pathogens by the complement system. *Vaccine*. 2008 Dec 30;26 Suppl 8:115–21.
36. Diebold CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science*. 2014 Mar 14;343(6176):1260–3.
37. Bally I, Rossi V, Lunardi T, Thielens NM, Gaboriaud C, Arlaud GJ. Identification of the C1q-binding Sites of Human C1r and C1s: a refined three-dimensional model of the C1 complex of complement. *J Biol Chem*. 2009 Jul 17;284(29):19340–8.
38. Ziccardi RJ. Activation of the early components of the classical complement pathway under physiologic conditions. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1981 May;126(5):1769–73.
39. Frederiksen PD, Thiel S, Larsen CB, Jensenius JC. M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. *Scand J Immunol*. 2005 Nov;62(5):462–73.
40. Krarup A, Thiel S, Hansen A, Fujita T, Jensenius JC. L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. *J Biol Chem*. 2004 Nov 12;279(46):47513–9.
41. Kidmose RT, Laursen NS, Dobó J, Kjaer TR, Sirotkina S, Yatime L, et al. Structural basis for activation of the complement system by component C4 cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 18;109(38):15425–30.
42. Ram S, Lewis LA, Rice PA. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Oct;23(4):740–80.
43. Forneris F, Ricklin D, Wu J, Tzekou A, Wallace RS, Lambris JD, et al. Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. *Science*. 2010 Dec 24;330(6012):1816–20.
44. Bexborn F, Andersson PO, Chen H, Nilsson B, Ekdahl KN. The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H<sub>2</sub>O)Bb). *Mol Immunol*. 2008 Apr;45(8):2370–9.
45. Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med*. 1975 Oct 1;142(4):856–63.
46. Hourcade DE. The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement. *J Biol Chem*. 2006 Jan 27;281(4):2128–32.
47. Degn SE, Thiel S. Humoral pattern recognition and the complement system. *Scand J Immunol*. 2013 Aug;78(2):181–93.

48. Blaum BS, Hannan JP, Herbert AP, Kavanagh D, Uhrín D, Stehle T. Structural basis for sialic acid-mediated self-recognition by complement factor H. *Nat Chem Biol.* 2015 Jan;11(1):77–82.
49. Bokisch VA, Müller-Eberhard HJ, Cochrane CG. Isolation of a fragment (C3a) of the third component of human complement containing anaphylatoxin and chemotactic activity and description of an anaphylatoxin inactivator of human serum. *J Exp Med.* 1969 May 1;129(5):1109–30.
50. Ember JA, Hugli TE. Complement factors and their receptors. *Immunopharmacology.* 1997 Dec;38(1-2):3–15.
51. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today.* 1991 Sep;12(9):322–6.
52. Mortensen S, Kidmose RT, Petersen SV, Szilágyi Á, Prohászka Z, Andersen GR. Structural Basis for the Function of Complement Component C4 within the Classical and Lectin Pathways of Complement. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2015 Jun 1;194(11):5488–96.
53. Kinoshita T, Takata Y, Kozono H, Takeda J, Hong KS, Inoue K. C5 convertase of the alternative complement pathway: covalent linkage between two C3b molecules within the trimolecular complex enzyme. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1988 Dec 1;141(11):3895–901.
54. Pangburn MK, Rawal N. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):1006–10.
55. Rawal N, Pangburn MK. Formation of high affinity C5 convertase of the classical pathway of complement. *J Biol Chem.* 2003 Oct 3;278(40):38476–83.
56. Preissner KT, Podack ER, Müller-Eberhard HJ. The membrane attack complex of complement: relation of C7 to the metastable membrane binding site of the intermediate complex C5b-7. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1985 Jul;135(1):445–51.
57. Hadders MA, Beringer DX, Gros P. Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science.* 2007 Sep 14;317(5844):1552–4.
58. Bubeck D. The making of a macromolecular machine: assembly of the membrane attack complex. *Biochemistry (Mosc).* 2014 Apr 1;53(12):1908–15.
59. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol Today.* 1991 Sep;12(9):318–20; discussion 321.
60. Esser AF. Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol Today.* 1991 Sep;12(9):316–8; discussion 321.
61. Koski CL, Ramm LE, Hammer CH, Mayer MM, Shin ML. Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jun;80(12):3816–20.
62. Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev.* 1991 Jul;4(3):359–95.
63. Tedesco F. Inherited complement deficiencies and bacterial infections. *Vaccine.* 2008 Dec 30;26 Suppl 8:I3–8.

64. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):729–40.
65. Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP. Control of the complement system. *Adv Immunol*. 1996;61:201–83.
66. Nilsson SC, Sim RB, Lea SM, Fremeaux-Bacchi V, Blom AM. Complement factor I in health and disease. *Mol Immunol*. 2011 Aug;48(14):1611–20.
67. Conrad DH, Carlo JR, Ruddy S. Interaction of beta1H globulin with cell-bound C3b: quantitative analysis of binding and influence of alternative pathway components on binding. *J Exp Med*. 1978 Jun 1;147(6):1792–805.
68. Bettoni S, Bresin E, Remuzzi G, Noris M, Donadelli R. Insights into the Effects of Complement Factor H on the Assembly and Decay of the Alternative Pathway C3 Proconvertase and C3 Convertase. *J Biol Chem*. 2016 Apr 8;291(15):8214–30.
69. Podos SD, Agarwal A, Huang M. Factor D. In: *The Complement FactsBook* [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2019 Sep 19]. p. 117–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128104200000122>
70. Davis AE, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost*. 2010 Nov;104(5):886–93.
71. Ziccardi RJ. A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1982 Jun;128(6):2505–8.
72. Kim DD, Song W-C. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2006 Mar;118(2-3):127–36.
73. Liszewski MK, Leung M, Cui W, Subramanian VB, Parkinson J, Barlow PN, et al. Dissecting sites important for complement regulatory activity in membrane cofactor protein (MCP; CD46). *J Biol Chem*. 2000 Dec 1;275(48):37692–701.
74. Blom AM, Zadura AF, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Positively charged amino acids at the interface between alpha-chain CCP1 and CCP2 of C4BP are required for regulation of the classical C3-convertase. *Mol Immunol*. 2000 Jun;37(8):445–53.
75. Blom AM. A cluster of positively charged amino acids in the alpha-chain of C4b-binding protein (C4BP) is pivotal for the regulation of the complement system and the interaction with bacteria. *Scand J Clin Lab Investig Suppl*. 2000;233:37–49.
76. Rawal N, Rajagopalan R, Salvi VP. Stringent regulation of complement lectin pathway C3/C5 convertase by C4b-binding protein (C4BP). *Mol Immunol*. 2009 Sep;46(15):2902–10.
77. Väkevä A, Laurila P, Meri S. Loss of expression of protectin (CD59) is associated with complement membrane attack complex deposition in myocardial infarction. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 1992 Nov;67(5):608–16.
78. Meri S, Waldmann H, Lachmann PJ. Distribution of protectin (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 1991 Nov;65(5):532–7.

79. Huang Y, Fedarovich A, Tomlinson S, Davies C. Crystal structure of CD59: implications for molecular recognition of the complement proteins C8 and C9 in the membrane-attack complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2007 Jun;63(Pt 6):714–21.
80. Sunyer JO, Lambris JD. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunol Rev*. 1998 Dec;166:39–57.
81. Nonaka M, Smith SL. Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish Shellfish Immunol*. 2000 Apr;10(3):215–28.
82. Nonaka M. Evolution of the complement system. *Curr Opin Immunol*. 2001 Feb;13(1):69–73.
83. Zarkadis IK, Mastellos D, Lambris JD. Phylogenetic aspects of the complement system. *Dev Comp Immunol*. 2001 Dec;25(8-9):745–62.
84. Nonaka M, Miyazawa S. Evolution of the initiating enzymes of the complement system. *Genome Biol*. 2002;3(1):REVIEWS1001.
85. Nonaka M, Takahashi M. Complete complementary DNA sequence of the third component of complement of lamprey. Implication for the evolution of thioester containing proteins. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1992 May 15;148(10):3290–5.
86. Ishiguro H, Kobayashi K, Suzuki M, Titani K, Tomonaga S, Kurosawa Y. Isolation of a hagfish gene that encodes a complement component. *EMBO J*. 1992 Mar;11(3):829–37.
87. Law SK, Dodds AW. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci Publ Protein Soc*. 1997 Feb;6(2):263–74.
88. Bentley DR. Structural superfamilies of the complement system. *Exp Clin Immunogenet*. 1988;5(2-3):69–80.
89. Carroll MC, Alicot EM, Katzman PJ, Klickstein LB, Smith JA, Fearon DT. Organization of the genes encoding complement receptors type 1 and 2, decay-accelerating factor, and C4-binding protein in the RCA locus on human chromosome 1. *J Exp Med*. 1988 Apr 1;167(4):1271–80.
90. Rey-Campos J, Rubinstein P, Rodriguez de Cordoba S. A physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. *J Exp Med*. 1988 Feb 1;167(2):664–9.
91. Bora NS, Lublin DM, Kumar BV, Hockett RD, Holers VM, Atkinson JP. Structural gene for human membrane cofactor protein (MCP) of complement maps to within 100 kb of the 3' end of the C3b/C4b receptor gene. *J Exp Med*. 1989 Feb 1;169(2):597–602.
92. Smith LC, Azumi K, Nonaka M. Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways. *Immunopharmacology*. 1999 May;42(1-3):107–20.
93. Dodds AW, Matsushita M. The phylogeny of the complement system and the origins of the classical pathway. *Immunobiology*. 2007;212(4-5):233–43.
94. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex

- class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):389–400.
95. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*. 1995 May 11;375(6527):151–5.
  96. Kitajima T, Ariizumi K, Bergstresser PR, Takashima A. A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J Clin Invest*. 1996 Jul 1;98(1):142–7.
  97. Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, et al. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*. 1997 Jun 12;387(6634):713–7.
  98. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med*. 1996 Oct 1;184(4):1413–24.
  99. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jul 13;12(8):557–69.
  100. Segura E, Amigorena S. Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. *Adv Immunol*. 2015;127:1–31.
  101. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998 Mar 5;392(6671):86–9.
  102. Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med*. 2000 Feb 7;191(3):435–44.
  103. Verbovetski I, Bychkov H, Trahtemberg U, Shapira I, Hareuveni M, Ben-Tal O, et al. Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med*. 2002 Dec 16;196(12):1553–61.
  104. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):279–88.
  105. Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JF, Kosaka H. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med*. 1996 Sep 1;184(3):923–30.
  106. Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF, Heath WR. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med*. 1997 Jul 21;186(2):239–45.
  107. Vilen BJ, Rutan JA. The regulation of autoreactive B cells during innate immune responses. *Immunol Res*. 2008;41(3):295–309.
  108. Chen M, Huang L, Wang J. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4360–7.



109. Haniffa M, Collin M, Ginhoux F. Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv Immunol.* 2013;120:1–49.
110. D’Amico A, Wu L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med.* 2003 Jul 21;198(2):293–303.
111. Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2003 Jul 21;198(2):305–13.
112. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science.* 2006 Jan 6;311(5757):83–7.
113. Sathe P, Metcalf D, Vremec D, Naik SH, Langdon WY, Huntington ND, et al. Lymphoid tissue and plasmacytoid dendritic cells and macrophages do not share a common macrophage-dendritic cell-restricted progenitor. *Immunity.* 2014 Jul 17;41(1):104–15.
114. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol.* 2007 Nov;8(11):1207–16.
115. Naik SH, Sathe P, Park H-Y, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol.* 2007 Nov;8(11):1217–26.
116. Cisse B, Caton ML, Lehner M, Maeda T, Scheu S, Locksley R, et al. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell.* 2008 Oct 3;135(1):37–48.
117. Musumeci A, Lutz K, Winheim E, Krug AB. What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity. *Front Immunol.* 2019;10:1222.
118. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245–52.
119. Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 2;96(3):1036–41.
120. Maldonado-López R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, et al. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med.* 1999 Feb 1;189(3):587–92.
121. Pulendran B, Palucka K, Banchereau J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science.* 2001 Jul 13;293(5528):253–6.
122. Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol.* 2010 Aug;11(8):647–55.
123. Pulendran B, Artis D. New paradigms in type 2 immunity. *Science.* 2012 Jul 27;337(6093):431–5.

124. Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med*. 1990 May 1;171(5):1753–71.
125. Pulendran B, Lingappa J, Kennedy MK, Smith J, Teepe M, Rudensky A, et al. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Sep 1;159(5):2222–31.
126. Reis e Sousa C, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med*. 1997 Dec 1;186(11):1819–29.
127. Den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med*. 2000 Dec 18;192(12):1685–96.
128. Bego MG, Mercier J, Cohen EA. Virus-activated interferon regulatory factor 7 upregulates expression of the interferon-regulated BST2 gene independently of interferon signaling. *J Virol*. 2012 Apr;86(7):3513–27.
129. Blasius AL, Giurisato E, Cella M, Schreiber RD, Shaw AS, Colonna M. Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Sep 1;177(5):3260–5.
130. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002 Mar;2(3):151–61.
131. Vremec D, Shortman K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Jul 15;159(2):565–73.
132. Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Jul 15;167(2):741–8.
133. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med*. 1996 Nov 1;184(5):1953–62.
134. Tang-Huau T-L, Segura E. Human in vivo-differentiated monocyte-derived dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;86:44–9.
135. Min J, Yang D, Kim M, Haam K, Yoo A, Choi J-H, et al. Inflammation induces two types of inflammatory dendritic cells in inflamed lymph nodes. *Exp Mol Med*. 2018 16;50(3):e458.
136. Brawand P, Fitzpatrick DR, Greenfield BW, Brasel K, Maliszewski CR, De Smedt T. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Dec 15;169(12):6711–9.
137. Weimershaus M, van Endert P. Preparation of dendritic cells by in vitro cultures. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013;960:351–7.

138. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1992 Dec 1;176(6):1693–702.
139. Guo X, Zhou Y, Wu T, Zhu X, Lai W, Wu L. Generation of mouse and human dendritic cells in vitro. *J Immunol Methods*. 2016 May;432:24–9.
140. Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, et al. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):878–84.
141. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2008 Sep 19;29(3):352–61.
142. Hammer GE, Ma A. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:743–91.
143. Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol Rev*. 2004 Jun;199:227–50.
144. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010 Jan 15;327(5963):291–5.
145. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805–20.
146. Kawasaki T, Kawai T, Akira S. Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunol Rev*. 2011 Sep;243(1):61–73.
147. Dzopalic T, Rajkovic I, Dragicevic A, Colic M. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunol Res*. 2012 Apr;52(1-2):20–33.
148. Hemmi H, Akira S. TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy*. 2005;86:120–35.
149. Wu J, Li S, Li T, Lv X, Zhang M, Zang G, et al. pDC Activation by TLR7/8 Ligand CL097 Compared to TLR7 Ligand IMQ or TLR9 Ligand CpG. *J Immunol Res*. 2019;2019:1749803.
150. Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, et al. The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, Dec-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation via Major Histocompatibility Complex Class II–Positive Lysosomal Compartments. *J Cell Biol*. 2000 Oct 30;151(3):673–84.
151. Tel J, Benitez-Ribas D, Hoosemans S, Cambi A, Adema GJ, Figdor CG, et al. DEC-205 mediates antigen uptake and presentation by both resting and activated human plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2011 Apr;41(4):1014–23.
152. Klechevsky E, Flamar A-L, Cao Y, Blanck J-P, Liu M, O’Bar A, et al. Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood*. 2010 Sep 9;116(10):1685–97.
153. Sancho D, Reis e Sousa C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:491–529.

154. Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol*. 2012 Mar 19;13(4):325–32.
155. Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*. 2012 Mar 19;13(4):333–42.
156. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:185–214.
157. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685–711.
158. Kamath AT, Pooley J, O’Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, et al. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Dec 15;165(12):6762–70.
159. Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ, Heath WR, et al. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood*. 2003 Sep 15;102(6):2187–94.
160. Shin J-S, Ebersold M, Pypaert M, Delamarre L, Hartley A, Mellman I. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature*. 2006 Nov 2;444(7115):115–8.
161. Ma JK, Platt MY, Eastham-Anderson J, Shin J-S, Mellman I. MHC class II distribution in dendritic cells and B cells is determined by ubiquitin chain length. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 5;109(23):8820–7.
162. Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:259–93.
163. Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM, et al. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*. 2000 Apr 21;288(5465):522–7.
164. Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science*. 2003 Feb 28;299(5611):1400–3.
165. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515–48.
166. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767–811.
167. Nijman HW, Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, Oorschot VM, Vierboom MP, van de Keur M, et al. Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med*. 1995 Jul 1;182(1):163–74.
168. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, et al. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*. 1997 Aug 21;388(6644):787–92.
169. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:975–1028.

170. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med*. 1997 Jan 20;185(2):317–28.
171. Cresswell P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*. 1996 Feb 23;84(4):505–7.
172. Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Mito-Yoshida M, Goto E, Aoki-Kawasumi M, Nakayama M, et al. Cutting edge: requirement of MARCH-I-mediated MHC II ubiquitination for the maintenance of conventional dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Dec 1;183(11):6893–7.
173. Baravalle G, Park H, McSweeney M, Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Ishido S, et al. Ubiquitination of CD86 is a key mechanism in regulating antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Sep 15;187(6):2966–73.
174. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 1998 Sep;28(9):2760–9.
175. Riol-Blanco L, Sánchez-Sánchez N, Torres A, Tejedor A, Narumiya S, Corbí AL, et al. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Apr 1;174(7):4070–80.
176. Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, et al. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Jul 1;169(1):424–33.
177. Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, et al. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Jan 15;176(2):803–10.
178. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jun;6(6):476–83.
179. Spörri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4<sup>+</sup> T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*. 2005 Feb;6(2):163–70.
180. Hou W-S, Van Parijs L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol*. 2004 Jun;5(6):583–9.
181. Li X, Jiang S, Tapping RI. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine*. 2010 Jan;49(1):1–9.
182. Zanoni I, Ostuni R, Capuano G, Collini M, Caccia M, Ronchi AE, et al. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature*. 2009 Jul 9;460(7252):264–8.
183. West MA, Wallin RPA, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren H-G, et al. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*. 2004 Aug 20;305(5687):1153–7.

184. Park S-J, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S-I, et al. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Sep 15;173(6):3844–54.
185. Melillo JA, Song L, Bhagat G, Blazquez AB, Plumlee CR, Lee C, et al. Dendritic Cell (DC)-Specific Targeting Reveals Stat3 as a Negative Regulator of DC Function. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2638–45.
186. Hutchins AP, Diez D, Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics*. 2013 Nov;12(6):489–98.
187. Kitamura H, Kamon H, Sawa S-I, Park S-J, Katunuma N, Ishihara K, et al. IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. *Immunity*. 2005 Nov;23(5):491–502.
188. Kitamura H, Ohno Y, Toyoshima Y, Ohtake J, Homma S, Kawamura H, et al. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci*. 2017 Oct;108(10):1947–52.
189. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:503–29.
190. Rudd BD, Luker GD, Luker KE, Peebles RS, Lukacs NW. Type I Interferon Regulates Respiratory Virus Infected Dendritic Cell Maturation and Cytokine Production. *Viral Immunol*. 2007 Dec;20(4):531–40.
191. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad R-C, Wheeler MT, Tsui C, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):1052–60.
192. Xuan NT, Wang X, Nishanth G, Waisman A, Borucki K, Isermann B, et al. A20 expression in dendritic cells protects mice from LPS-induced mortality. *Eur J Immunol*. 2015 Mar;45(3):818–28.
193. Hammer GE, Turer EE, Taylor KE, Fang CJ, Advincula R, Oshima S, et al. Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis. *Nat Immunol*. 2011 Oct 23;12(12):1184–93.
194. Kool M, van Loo G, Waelput W, De Prijck S, Muskens F, Sze M, et al. The ubiquitin-editing protein A20 prevents dendritic cell activation, recognition of apoptotic cells, and systemic autoimmunity. *Immunity*. 2011 Jul 22;35(1):82–96.
195. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 1998 Sep 3;395(6697):82–6.
196. Alarcón B, Mestre D, Martínez-Martín N. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology*. 2011 Aug;133(4):420–5.
197. Tai Y, Wang Q, Korner H, Zhang L, Wei W. Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Front Pharmacol*. 2018;9:642.

198. Rouard H, Marquet J, Léon A, Maison P, Haioun C, Copie-Bergman C, et al. IL-12 secreting dendritic cells are required for optimum activation of human secondary lymphoid tissue T cells. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2002 Aug;25(4):324–33.
199. Lutz MB. Induction of CD4(+) Regulatory and Polarized Effector/helper T Cells by Dendritic Cells. *Immune Netw*. 2016 Feb;16(1):13–25.
200. Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*. 1999 Dec;20(12):561–7.
201. Al-Alwan MM, Liwski RS, Haeryfar SMM, Baldrige WH, Hoskin DW, Rowden G, et al. Cutting edge: dendritic cell actin cytoskeletal polarization during immunological synapse formation is highly antigen-dependent. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Nov 1;171(9):4479–83.
202. Al-Alwan MM, Rowden G, Lee TD, West KA. The dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Feb 1;166(3):1452–6.
203. Ueda H, Zhou J, Xie J, Davis MM. Distinct Roles of Cytoskeletal Components in Immunological Synapse Formation and Directed Secretion. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Nov 1;195(9):4117–25.
204. Ritter AT, Angus KL, Griffiths GM. The role of the cytoskeleton at the immunological synapse. *Immunol Rev*. 2013 Nov;256(1):107–17.
205. De Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JHN, Tanaka Y, Wierenga EA, et al. Microbial Compounds Selectively Induce Th1 Cell-Promoting or Th2 Cell-Promoting Dendritic Cells In Vitro with Diverse Th Cell-Polarizing Signals. *J Immunol*. 2002 Feb 15;168(4):1704–9.
206. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*. 2000 Oct;1(4):311–6.
207. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*. 2000 Sep;1(3):199–205.
208. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003 Dec;3(12):984–93.
209. Bonnefoy F, Couturier M, Clauzon A, Rémy-Martin J-P, Gaugler B, Tiberghien P, et al. TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Jun 1;186(11):6157–64.
210. Gautreau L, Chabannes D, Heslan M, Josien R. Modulation of regulatory T cell-Th17 balance by plasmacytoid dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2011 Sep;90(3):521–7.
211. Kopecka J, Rozkova D, Sediva A. Plasmacytoid DCs, exposed to TSLP in synergy with TLR ligands, acquire significant potential towards Th2 polarization. *Med Sci Monit Basic Res*. 2013 Dec 13;19:291–9.
212. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):747–52.

213. Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kämpgen E, et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):741–6.
214. Maldonado-López R, Maliszewski C, Urbain J, Moser M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Oct 15;167(8):4345–50.
215. Ng CT, Oldstone MBA. Infected CD8 $\alpha$ - dendritic cells are the predominant source of IL-10 during establishment of persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 28;109(35):14116–21.
216. Schlecht G, Leclerc C, Dadaglio G. Induction of CTL and nonpolarized Th cell responses by CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Oct 15;167(8):4215–21.
217. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*. 1996 Mar;4(3):313–9.
218. Manickasingham SP, Edwards AD, Schulz O, Reis e Sousa C. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur J Immunol*. 2003 Jan;33(1):101–7.
219. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Feb;3(2):133–46.
220. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1995 May 15;154(10):5071–9.
221. Edwards AD, Manickasingham SP, Spörri R, Diebold SS, Schulz O, Sher A, et al. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Oct 1;169(7):3652–60.
222. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655–69.
223. Lugo-Villarino G, Maldonado-Lopez R, Possemato R, Penaranda C, Glimcher LH. T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7749–54.
224. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445–89.
225. Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, et al. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Apr 15;172(8):4733–43.
226. León B, Ballesteros-Tato A, Lund FE. Dendritic cells and B cells: unexpected partners in Th2 development. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 Aug 15;193(4):1531–7.



227. León B, Ballesteros-Tato A, Browning JL, Dunn R, Randall TD, Lund FE. Regulation of T(H)2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. *Nat Immunol*. 2012 May 27;13(7):681–90.
228. Tang H, Cao W, Kasturi SP, Ravindran R, Nakaya HI, Kundu K, et al. The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell-basophil cooperation via ROS-mediated signaling. *Nat Immunol*. 2010 Jul;11(7):608–17.
229. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 2010 Apr;10(4):225–35.
230. Zúñiga LA, Jain R, Haines C, Cua DJ. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev*. 2013 Mar;252(1):78–88.
231. Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015 Dec;63(6):435–49.
232. Han L, Yang J, Wang X, Li D, Lv L, Li B. Th17 cells in autoimmune diseases. *Front Med*. 2015 Mar;9(1):10–9.
233. Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev*. 2011 May;241(1):206–27.
234. Ohnmacht C, Pullner A, King SBS, Drexler I, Meier S, Brocker T, et al. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med*. 2009 Mar 16;206(3):549–59.
235. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2007 Aug;7(8):610–21.
236. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*. 2013 Mar 21;38(3):414–23.
237. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531–64.
238. Dhabhar FS, Viswanathan K. Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Sep;289(3):R738–44.
239. Dhabhar FS, McEWEN BS. Bi-directional Effects of Stress on Immune Function: Possible Explanations for Salubrious as Well as Harmful Effects. In: *Psychoneuroimmunology* [Internet]. Elsevier; 2007 [cited 2019 Jul 3]. p. 723–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780120885763500411>
240. Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun*. 1997 Dec;11(4):286–306.
241. Irwin M, Patterson T, Smith TL, Caldwell C, Brown SA, Gillin JC, et al. Reduction of immune function in life stress and depression. *Biol Psychiatry*. 1990 Jan 1;27(1):22–30.

242. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):243–51.
243. Godbout JP, Glaser R. Stress-Induced Immune Dysregulation: Implications for Wound Healing, Infectious Disease and Cancer. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006 Nov 16;1(4):421–7.
244. Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(5):300–17.
245. Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E, McEwen BS. Stress-induced redistribution of immune cells--from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones--Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology*. 2012 Sep;37(9):1345–68.
246. Padro CJ, Sanders VM. Neuroendocrine regulation of inflammation. *Semin Immunol*. 2014 Oct;26(5):357–68.
247. Gunnar M, Quevedo K. The neurobiology of stress and development. *Annu Rev Psychol*. 2007;58:145–73.
248. Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL. Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticosteroid-binding globulin levels--a comparison between Sprague-Dawley, Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res*. 1993 Jul 9;616(1-2):89–98.
249. Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL. Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology*. 1997 May;65(5):360–8.
250. Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL. Differential activation of adrenal steroid receptors in neural and immune tissues of Sprague Dawley, Fischer 344, and Lewis rats. *J Neuroimmunol*. 1995 Jan;56(1):77–90.
251. Gomez-Serrano M, Tonelli L, Listwak S, Sternberg E, Riley AL. Effects of cross fostering on open-field behavior, acoustic startle, lipopolysaccharide-induced corticosterone release, and body weight in Lewis and Fischer rats. *Behav Genet*. 2001 Sep;31(5):427–36.
252. Schwab CL, Fan R, Zheng Q, Myers LP, Hébert P, Pruett SB. Modeling and predicting stress-induced immunosuppression in mice using blood parameters. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2005 Jan;83(1):101–13.
253. Benschop RJ, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav Immun*. 1996 Jun;10(2):77–91.
254. Selye H. Endocrine reactions during stress. *Curr Res Anesth Analg*. 1956 Jun;35(3):182–93.
255. Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8(4):383–95.
256. Steptoe A, Hamer M, Chida Y. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 2007 Oct;21(7):901–12.

257. Puterman E, Epel ES, O'Donovan A, Prather AA, Aschbacher K, Dhabhar FS. Anger is associated with increased IL-6 stress reactivity in women, but only among those low in social support. *Int J Behav Med*. 2014 Dec;21(6):936–45.
258. Aschbacher K, Epel E, Wolkowitz OM, Prather AA, Puterman E, Dhabhar FS. Maintenance of a positive outlook during acute stress protects against pro-inflammatory reactivity and future depressive symptoms. *Brain Behav Immun*. 2012 Feb;26(2):346–52.
259. Carlson LA, Levi L, Orö L. Plasma lipids and urinary excretion of catecholamines in man during experimentally induced emotional stress, and their modification by nicotinic acid. *J Clin Invest*. 1968 Aug;47(8):1795–805.
260. De Boer SF, Koopmans SJ, Slangen JL, Van der Gugten J. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol Behav*. 1990 Jun;47(6):1117–24.
261. Ranabir S, Reetu K. Stress and hormones. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011 Jan;15(1):18–22.
262. Wortsman J. Role of epinephrine in acute stress. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2002 Mar;31(1):79–106.
263. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol*. 1999 Jan;160(1):1–12.
264. Assad S, Khan HH, Ghazanfar H, Khan ZH, Mansoor S, Rahman MA, et al. Role of Sex Hormone Levels and Psychological Stress in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Cureus*. 2017 Jun 5;9(6):e1315.
265. Porcelli B, Pozza A, Bizzaro N, Fagiolini A, Costantini M-C, Terzuoli L, et al. Association between stressful life events and autoimmune diseases: A systematic review and meta-analysis of retrospective case-control studies. *Autoimmun Rev*. 2016 Apr;15(4):325–34.
266. Sephton S, Spiegel D. Circadian disruption in cancer: a neuroendocrine-immune pathway from stress to disease? *Brain Behav Immun*. 2003 Oct;17(5):321–8.
267. Saul AN, Oberyszyn TM, Daugherty C, Kusewitt D, Jones S, Jewell S, et al. Chronic stress and susceptibility to skin cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Dec 7;97(23):1760–7.
268. Chen Y, Lyga J. Brain-Skin Connection: Stress, Inflammation and Skin Aging. *Inflamm Allergy-Drug Targets*. 2014 Jun 31;13(3):177–90.
269. Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005 Dec;29(8):1201–13.
270. Goldstein DS. Stress-induced activation of the sympathetic nervous system. *Baillières Clin Endocrinol Metab*. 1987 May;1(2):253–78.
271. Palkovits M. Catecholamines in the Hypothalamus: An Anatomical Review. *Neuroendocrinology*. 1981;33(2):123–8.

272. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 1981 Sep 18;213(4514):1394–7.
273. Patel PD, Lopez JF, Lyons DM, Burke S, Wallace M, Schatzberg AF. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *J Psychiatr Res*. 2000 Dec;34(6):383–92.
274. Seckl JR, Dickson KL, Yates C, Fink G. Distribution of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNA expression in human postmortem hippocampus. *Brain Res*. 1991 Oct 11;561(2):332–7.
275. Lattin CR, Waldron-Francis K, Richardson JW, de Bruijn R, Bauer CM, Breuner CW, et al. Pharmacological characterization of intracellular glucocorticoid receptors in nine tissues from house sparrow (*Passer domesticus*). *Gen Comp Endocrinol*. 2012 Nov;179(2):214–20.
276. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. 1998 Jun;19(3):269–301.
277. Finsterwald C, Alberini CM. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: From adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiol Learn Mem*. 2014 Jul;112:17–29.
278. Arola J, Heikkilä P, Voutilainen R, Kahri AI. Corticosterone regulates cell proliferation and cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme messenger ribonucleic acid expression in primary cultures of fetal rat adrenals. *Endocrinology*. 1994 Nov;135(5):2064–9.
279. Carsia RV, Malamed S. Glucocorticoid control of steroidogenesis in isolated rat adrenocortical cells. *Biochim Biophys Acta*. 1983 Aug 17;763(1):83–9.
280. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gatekeepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev*. 2013 Jul;93(3):1139–206.
281. Pariante CM, Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*. 2008 Sep;31(9):464–8.
282. Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2013 Sep;34(9):518–30.
283. Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2001 Jul;26(5):443–59.
284. Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*. 2003 Jul;119(3):887–97.
285. Dinan TG. Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *Br J Psychiatry J Ment Sci*. 1994 Mar;164(3):365–71.
286. Dunn AJ. The role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in the neurochemical and neuroendocrine responses to endotoxin. *Brain Res Bull*. 1992 Dec;29(6):807–12.

287. Maes M, Smith R, Scharpe S. The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinology*. 1995;20(2):111–6.
288. Townsend LW. Implications of the space radiation environment for human exploration in deep space. *Radiat Prot Dosimetry*. 2005;115(1-4):44–50.
289. Cucinotta FA, Durante M. Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings. *Lancet Oncol*. 2006 May;7(5):431–5.
290. Cucinotta FA, Kim M-HY, Chappell LJ, Huff JL. How safe is safe enough? Radiation risk for a human mission to Mars. *PLoS One*. 2013;8(10):e74988.
291. Kennedy AR. Biological Effects of Space Radiation and Development of Effective Countermeasures. *Life Sci Space Res*. 2014 Apr 1;1:10–43.
292. Cucinotta FA, Manuel FK, Jones J, Iszard G, Murrey J, Djojonegro B, et al. Space radiation and cataracts in astronauts. *Radiat Res*. 2001 Nov;156(5 Pt 1):460–6.
293. Rastegar N, Eckart P, Mertz M. Radiation-induced cataract in astronauts and cosmonauts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 2002 Jul;240(7):543–7.
294. Donnelly EH, Nemhauser JB, Smith JM, Kazzi ZN, Farfán EB, Chang AS, et al. Acute radiation syndrome: assessment and management. *South Med J*. 2010 Jun;103(6):541–6.
295. Almeida-Porada G, Rodman C, Kuhlman B, Brudvik E, Moon J, George S, et al. Exposure of the Bone Marrow Microenvironment to Simulated Solar and Galactic Cosmic Radiation Induces Biological Bystander Effects on Human Hematopoiesis. *Stem Cells Dev*. 2018 Sep 15;27(18):1237–56.
296. Norbury JW, Schimmerling W, Slaba TC, Azzam EI, Badavi FF, Baiocco G, et al. Galactic cosmic ray simulation at the NASA Space Radiation Laboratory. *Life Sci Space Res*. 2016 Feb;8:38–51.
297. Cacioppo JT, Patrick W. *Loneliness: human nature and the need for social connection*. 1st. ed. New York: Norton; 2008. 317 p.
298. Rasmussen JE, editor. *Man in isolation and confinement*. Chicago: Aldine Pub. Co; 1973. 330 p. (Modern applications of psychology).
299. Lugg DJ. Behavioral health in Antarctica: implications for long-duration space missions. *Aviat Space Environ Med*. 2005 Jun;76(6 Suppl):B74–7.
300. Tanaka M, Watanabe S. Overwintering in the Antarctica as an analog for long term manned spaceflight. *Adv Space Res Off J Comm Space Res COSPAR*. 1994;14(8):423–30.
301. Palinkas LA, Gunderson EK, Holland AW, Miller C, Johnson JC. Predictors of behavior and performance in extreme environments: the Antarctic space analogue program. *Aviat Space Environ Med*. 2000 Jun;71(6):619–25.
302. Palinkas LA. Psychosocial effects of adjustment in Antarctica: lessons for long-duration spaceflight. *J Spacecr Rockets*. 1990 Oct;27(5):471–7.

303. Todd B, Reagan M. The NEEMO Project: A Report on How NASA Utilizes the `` *Aquarius* Undersea Habitat as an Analog for Long-Duration Space Flight. In: Engineering, Construction, and Operations in Challenging Environments [Internet]. League City, Houston, Texas, United States: American Society of Civil Engineers; 2004 [cited 2019 Sep 20]. p. 751–8. Available from: <http://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/40722%28153%29103>
304. Palinkas LA, Gunderson EK, Johnson JC, Holland AW. Behavior and performance on long-duration spaceflights: evidence from analogue environments. *Aviat Space Environ Med.* 2000 Sep;71(9 Suppl):A29–36.
305. Friedman E, Bui B. A Psychiatric Formulary for Long-Duration Spaceflight. *Aerosp Med Hum Perform.* 2017 Nov 1;88(11):1024–33.
306. Musson DM, Helmreich RL. Long-term personality data collection in support of spaceflight and analogue research. *Aviat Space Environ Med.* 2005 Jun;76(6 Suppl):B119–25.
307. Palinkas LA, Suedfeld P. Psychological effects of polar expeditions. *Lancet Lond Engl.* 2008 Jan 12;371(9607):153–63.
308. Gunderson EK. EMOTIONAL SYMPTOMS IN EXTREMELY ISOLATED GROUPS. *Arch Gen Psychiatry.* 1963 Oct;9:362–8.
309. Law P. Personality problems in Antarctica. *Med J Aust.* 1960 Feb 20;47(1):273–82.
310. Mullin CS. Some psychological aspects of isolated Antarctic living. *Am J Psychiatry.* 1960 Oct;117:323–5.
311. Reed HL, Reedy KR, Palinkas LA, Van Do N, Finney NS, Case HS, et al. Impairment in cognitive and exercise performance during prolonged antarctic residence: effect of thyroxine supplementation in the polar triiodothyronine syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jan;86(1):110–6.
312. Abeln V, MacDonald-Nethercott E, Piacentini MF, Meeusen R, Kleinert J, Strueder HK, et al. Exercise in isolation--a countermeasure for electrocortical, mental and cognitive impairments. *PloS One.* 2015;10(5):e0126356.
313. Le Scanff C, Larue J, Rosnet E. How to measure human adaptation in extreme environments: the case of Antarctic wintering-over. *Aviat Space Environ Med.* 1997 Dec;68(12):1144–9.
314. Palinkas LA, Reedy KR, Shepanek M, Reeves D, Samuel Case H, Van Do N, et al. A randomized placebo-controlled clinical trial of the effectiveness of thyroxine and triiodothyronine and short-term exposure to bright light in prevention of decrements in cognitive performance and mood during prolonged Antarctic residence. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010 Apr;72(4):543–50.
315. Gemignani A, Piarulli A, Menicucci D, Laurino M, Rota G, Mastorci F, et al. How stressful are 105 days of isolation? Sleep EEG patterns and tonic cortisol in healthy volunteers simulating manned flight to Mars. *Int J Psychophysiol Off J Int Organ Psychophysiol.* 2014 Aug;93(2):211–9.
316. Strewe C, Muckenthaler F, Feuerecker M, Yi B, Rykova M, Kaufmann I, et al. Functional changes in neutrophils and psychoneuroendocrine responses during 105 days of confinement. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2015 May 1;118(9):1122–7.

317. Jacobowski A, Abeln V, Vogt T, Yi B, Choukèr A, Fomina E, et al. The impact of long-term confinement and exercise on central and peripheral stress markers. *Physiol Behav.* 2015 Dec 1;152(Pt A):106–11.
318. Yi B, Matzel S, Feuerecker M, Hörl M, Ladinig C, Abeln V, et al. The impact of chronic stress burden of 520-d isolation and confinement on the physiological response to subsequent acute stress challenge. *Behav Brain Res.* 2015 Mar 15;281:111–5.
319. Yi B, Rykova M, Feuerecker M, Jäger B, Ladinig C, Basner M, et al. 520-d Isolation and confinement simulating a flight to Mars reveals heightened immune responses and alterations of leukocyte phenotype. *Brain Behav Immun.* 2014 Aug;40:203–10.
320. Yi B, Nichiporuk I, Nicolas M, Schneider S, Feuerecker M, Vassilieva G, et al. Reductions in circulating endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol levels in healthy human subjects exposed to chronic stressors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016 Jun 3;67:92–7.
321. Belavý DL, Gast U, Daumer M, Fomina E, Rawer R, Schießl H, et al. Progressive adaptation in physical activity and neuromuscular performance during 520d confinement. *PLoS One.* 2013;8(3):e60090.
322. Vigo DE, Tuerlinckx F, Ogrinz B, Wan L, Simonelli G, Bersenev E, et al. Circadian rhythm of autonomic cardiovascular control during Mars500 simulated mission to Mars. *Aviat Space Environ Med.* 2013 Oct;84(10):1023–8.
323. Basner M, Dinges DF, Mollicone D, Ecker A, Jones CW, Hyder EC, et al. Mars 520-d mission simulation reveals protracted crew hypokinesia and alterations of sleep duration and timing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 12;110(7):2635–40.
324. Basner M, Dinges DF, Mollicone DJ, Savelev I, Ecker AJ, Di Antonio A, et al. Psychological and behavioral changes during confinement in a 520-day simulated interplanetary mission to Mars. *PLoS One.* 2014;9(3):e93298.
325. Cloud DH, Drucker E, Browne A, Parsons J. Public Health and Solitary Confinement in the United States. *Am J Public Health.* 2015 Jan;105(1):18–26.
326. Goel N, Dinges DF. Predicting Risk in Space: Genetic Markers for Differential Vulnerability to Sleep Restriction. *Acta Astronaut.* 2012 Aug;77:207–13.
327. Valtchanov D, Barton KR, Ellard C. Restorative effects of virtual nature settings. *Cyberpsychology Behav Soc Netw.* 2010 Oct;13(5):503–12.
328. Kanas N, Salnitskiy V, Grund EM, Gushin V, Weiss DS, Kozerenko O, et al. Lessons learned from Shuttle/Mir: psychosocial countermeasures. *Aviat Space Environ Med.* 2002 Jun;73(6):607–11.
329. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress.* 2017 Feb;6:78–93.
330. Willner P. Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. *Neurobiol Stress.* 2017 Feb;6:68–77.
331. Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 1992;16(4):525–34.

332. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997 Dec;134(4):319–29.
333. Kling MA, Coleman VH, Schulkin J. Glucocorticoid inhibition in the treatment of depression: can we think outside the endocrine hypothalamus? *Depress Anxiety*. 2009;26(7):641–9.
334. Gallagher P, Malik N, Newham J, Young AH, Ferrier IN, Mackin P. Antiglucocorticoid treatments for mood disorders. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Jan 23;(1):CD005168.
335. Wu L-M, Han H, Wang Q-N, Hou H-L, Tong H, Yan X-B, et al. Mifepristone repairs region-dependent alteration of synapsin I in hippocampus in rat model of depression. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2007 Dec;32(12):2500–10.
336. Ducottet C, Griebel G, Belzung C. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 Jun;27(4):625–31.
337. Antoniuk S, Bijata M, Ponimaskin E, Wlodarczyk J. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019;99:101–16.
338. Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*. 2008 Jul;13(7):717–28.
339. Kvarta MD, Bradbrook KE, Dantrassy HM, Bailey AM, Thompson SM. Corticosterone mediates the synaptic and behavioral effects of chronic stress at rat hippocampal temporoammonic synapses. *J Neurophysiol*. 2015 Sep;114(3):1713–24.
340. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;93(3):358–64.
341. Remus JL, Stewart LT, Camp RM, Novak CM, Johnson JD. Interaction of metabolic stress with chronic mild stress in altering brain cytokines and sucrose preference. *Behav Neurosci*. 2015 Jun;129(3):321–30.
342. Gaignier F, Legrand-Frossi C, Stragier E, Mathiot J, Merlin J-L, Cohen-Salmon C, et al. A Model of Chronic Exposure to Unpredictable Mild Socio-Environmental Stressors Replicates Some Spaceflight-Induced Immunological Changes. *Front Physiol*. 2018;9:514.
343. Fonte C, Kaminski S, Vanet A, Lanfumey L, Cohen-Salmon C, Ghislin S, et al. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR- $\beta$  repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2019 Jan;33(1):896–908.
344. Albrecht-Buehler G. The simulation of microgravity conditions on the ground. *ASGSB Bull Publ Am Soc Gravitational Space Biol*. 1992 Oct;5(2):3–10.
345. Limbach C, Hauslage J, Schäfer C, Braun M. How to activate a plant gravireceptor. Early mechanisms of gravity sensing studied in characean rhizoids during parabolic flights. *Plant Physiol*. 2005 Oct;139(2):1030–40.



346. Miller MS, Keller TS. Measuring *Drosophila* (fruit fly) activity during microgravity exposure. *J Gravitational Physiol J Int Soc Gravitational Physiol*. 1999 Jul;6(1):P99–100.
347. Boonstra J. Growth factor-induced signal transduction in adherent mammalian cells is sensitive to gravity. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1999;13 Suppl:S35–42.
348. Duprat AM, Husson D, Gualandris-Parisot L. Does gravity influence the early stages of the development of the nervous system in an amphibian? *Brain Res Brain Res Rev*. 1998 Nov;28(1-2):19–24.
349. Qian AR, Wang L, Gao X, Zhang W, Hu LF, Han J, et al. Diamagnetic levitation causes changes in the morphology, cytoskeleton, and focal adhesion proteins expression in osteocytes. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2012 Jan;59(1):68–77.
350. Valles JM, Lin K, Denegre JM, Mowry KL. Stable magnetic field gradient levitation of *Xenopus laevis*: toward low-gravity simulation. *Biophys J*. 1997 Aug;73(2):1130–3.
351. Herranz R, Larkin OJ, Dijkstra CE, Hill RJA, Anthony P, Davey MR, et al. Microgravity simulation by diamagnetic levitation: effects of a strong gradient magnetic field on the transcriptional profile of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*. 2012 Feb 1;13:52.
352. Hammer BE, Kidder LS, Williams PC, Xu WW. Magnetic Levitation of MC3T3 Osteoblast Cells as a Ground-Based Simulation of Microgravity. *Microgravity Sci Technol*. 2009 Nov;21(4):311–8.
353. Valles JM, Maris HJ, Seidel GM, Tang J, Yao W. Magnetic levitation-based Martian and Lunar gravity simulator. *Adv Space Res Off J Comm Space Res COSPAR*. 2005;36(1):114–8.
354. Türker E, Demirçak N, Arslan-Yildiz A. Scaffold-free three-dimensional cell culturing using magnetic levitation. *Biomater Sci*. 2018 Jun 25;6(7):1745–53.
355. Anil-Inevi M, Yaman S, Yildiz AA, Mese G, Yalcin-Ozuysal O, Tekin HC, et al. Biofabrication of in situ Self Assembled 3D Cell Cultures in a Weightlessness Environment Generated using Magnetic Levitation. *Sci Rep*. 2018 08;8(1):7239.
356. Funk RHW, Monsees TK. Effects of Electromagnetic Fields on Cells: Physiological and Therapeutical Approaches and Molecular Mechanisms of Interaction. *Cells Tissues Organs*. 2006;182(2):59–78.
357. Zablotskii V, Polyakova T, Lunov O, Dejneka A. How a High-Gradient Magnetic Field Could Affect Cell Life. *Sci Rep*. 2016 18;6:37407.
358. Klaus DM. Clinostats and bioreactors. *Gravitational Space Biol Bull Publ Am Soc Gravitational Space Biol*. 2001 Jun;14(2):55–64.
359. Herranz R, Anken R, Boonstra J, Braun M, Christianen PCM, de Geest M, et al. Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology*. 2013 Jan;13(1):1–17.
360. Briegleb W. Some qualitative and quantitative aspects of the fast-rotating clinostat as a research tool. *ASGSB Bull Publ Am Soc Gravitational Space Biol*. 1992 Oct;5(2):23–30.
361. Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Yamashita M, Buchen B. Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta*. 1997;203 Suppl:S187–97.

362. Borst AG, van Loon JJWA. Technology and Developments for the Random Positioning Machine, RPM. *Microgravity Sci Technol.* 2009 Nov;21(4):287–92.
363. Van Loon JJWA. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. *Adv Space Res.* 2007 Jan;39(7):1161–5.
364. Wuest SL, Richard S, Kopp S, Grimm D, Egli M. Simulated microgravity: critical review on the use of random positioning machines for mammalian cell culture. *BioMed Res Int.* 2015;2015:971474.
365. Wuest SL, Stern P, Casartelli E, Egli M. Fluid Dynamics Appearing during Simulated Microgravity Using Random Positioning Machines. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170826.
366. Benavides Damm T, Walther I, Wüest SL, Sekler J, Egli M. Cell cultivation under different gravitational loads using a novel random positioning incubator. *Biotechnol Bioeng.* 2014 Jun;111(6):1180–90.
367. Homick JL. Space motion sickness. *Acta Astronaut.* 1979 Oct;6(10):1259–72.
368. Lackner JR. Spatial orientation in weightless environments. *Perception.* 1992;21(6):803–12.
369. Buckley JC, Gaffney FA, Lane LD, Levine BD, Watenpaugh DE, Wright SJ, et al. Central venous pressure in space. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1996 Jul;81(1):19–25.
370. Schlegel TT, Benavides EW, Barker DC, Brown TE, Harm DL, DeSilva SJ, et al. Cardiovascular and Valsalva responses during parabolic flight. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1998 Nov;85(5):1957–65.
371. Bailliart O, Capderou A, Cholley BP, Kays C, Rivière D, Téchoueyres P, et al. Changes in lower limb volume in humans during parabolic flight. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1998 Dec;85(6):2100–5.
372. Mukai CN, Lathers CM, Charles JB, Bennett BS, Igarashi M, Patel S. Acute hemodynamic responses to weightlessness during parabolic flight. *J Clin Pharmacol.* 1991 Oct;31(10):993–1000.
373. Campbell MR, Billica RD. A review of microgravity surgical investigations. *Aviat Space Environ Med.* 1992 Jun;63(6):524–8.
374. Campbell MR, Billica RD, Johnston SL. Surgical bleeding in microgravity. *Surg Gynecol Obstet.* 1993 Aug;177(2):121–5.
375. Campbell MR, Dawson DL, Melton S, Hooker D, Cantu H. Surgical instrument restraint in weightlessness. *Aviat Space Environ Med.* 2001 Oct;72(10):871–6.
376. Rafiq A, Hummel R, Lavrentyev V, Derry W, Williams D, Merrell RC. Microgravity effects on fine motor skills: tying surgical knots during parabolic flight. *Aviat Space Environ Med.* 2006 Aug;77(8):852–6.
377. Cavanagh P, Rice A, Glauberman M, Sudduth A, Cheronas A, Davis S, et al. Ground Reaction Forces During Reduced Gravity Running in Parabolic Flight. *Aerosp Med Hum Perform.* 2017 Aug 1;88(8):730–6.

378. Zeredo JL, Toda K, Matsuura M, Kumei Y. Behavioral responses to partial-gravity conditions in rats. *Neurosci Lett*. 2012 Nov 7;529(2):108–11.
379. Clément G. Effects of varying gravity levels in parabolic flight on the size-mass illusion. *PLoS One*. 2014;9(6):e99188.
380. Campbell MR, Garbino A. History of suborbital spaceflight: medical and performance issues. *Aviat Space Environ Med*. 2011 Apr;82(4):469–74.
381. Haerkens MHTM, Simons R, Kuipers A. [Doctor, may I travel in space? Aeromedical considerations regarding commercial suborbital space flights]. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2011;155(48):A3904.
382. Spaak J, Sundblad P, Linnarsson D. Impaired pressor response after spaceflight and bed rest: evidence for cardiovascular dysfunction. *Eur J Appl Physiol*. 2001 Jul;85(1-2):49–55.
383. Convertino VA. Consequences of cardiovascular adaptation to spaceflight: implications for the use of pharmacological countermeasures. *Gravitational Space Biol Bull Publ Am Soc Gravitational Space Biol*. 2005 Jun;18(2):59–69.
384. Cappellesso R, Nicole L, Guido A, Pizzol D. Spaceflight osteoporosis: current state and future perspective. *Endocr Regul*. 2015 Oct;49(4):231–9.
385. Stein TP. Weight, muscle and bone loss during space flight: another perspective. *Eur J Appl Physiol*. 2013 Sep;113(9):2171–81.
386. Fitts RH, Trappe SW, Costill DL, Gallagher PM, Creer AC, Colloton PA, et al. Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol*. 2010 Sep 15;588(Pt 18):3567–92.
387. Armbrecht G, Belavý DL, Backström M, Beller G, Alexandre C, Rizzoli R, et al. Trabecular and cortical bone density and architecture in women after 60 days of bed rest using high-resolution pQCT: WISE 2005. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2011 Oct;26(10):2399–410.
388. Belavy DL, Beller G, Ritter Z, Felsenberg D. Bone structure and density via HR-pQCT in 60d bed-rest, 2-years recovery with and without countermeasures. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2011 Sep;11(3):215–26.
389. Vico L, Chappard D, Alexandre C, Palle S, Minaire P, Riffat G, et al. Effects of a 120 day period of bed-rest on bone mass and bone cell activities in man: attempts at countermeasure. *Bone Miner*. 1987 Aug;2(5):383–94.
390. Zerwekh JE, Ruml LA, Gottschalk F, Pak CY. The effects of twelve weeks of bed rest on bone histology, biochemical markers of bone turnover, and calcium homeostasis in eleven normal subjects. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1998 Oct;13(10):1594–601.
391. Lang T, LeBlanc A, Evans H, Lu Y, Genant H, Yu A. Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2004 Jun;19(6):1006–12.
392. LeBlanc AD, Spector ER, Evans HJ, Sibonga JD. Skeletal responses to space flight and the bed rest analog: a review. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007 Mar;7(1):33–47.

393. Taylor WE, Bhasin S, Lalani R, Datta A, Gonzalez-Cadavid NF. Alteration of gene expression profiles in skeletal muscle of rats exposed to microgravity during a spaceflight. *J Gravitational Physiol J Int Soc Gravitational Physiol*. 2002 Dec;9(2):61–70.
394. Steffen JM, Musacchia XJ. Spaceflight effects on adult rat muscle protein, nucleic acids, and amino acids. *Am J Physiol*. 1986 Dec;251(6 Pt 2):R1059–63.
395. Riley DA, Ellis S, Slocum GR, Sedlak FR, Bain JL, Krippendorf BB, et al. In-flight and postflight changes in skeletal muscles of SLS-1 and SLS-2 spaceflown rats. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1996 Jul;81(1):133–44.
396. Dirks ML, Wall BT, van de Valk B, Holloway TM, Holloway GP, Chabowski A, et al. 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*. 2016;65(10):2862–75.
397. Kramer A, Gollhofer A, Armbrecht G, Felsenberg D, Gruber M. How to prevent the detrimental effects of two months of bed-rest on muscle, bone and cardiovascular system: an RCT. *Sci Rep*. 2017 13;7(1):13177.
398. Vernikos J, Schneider VS. Space, gravity and the physiology of aging: parallel or convergent disciplines? A mini-review. *Gerontology*. 2010;56(2):157–66.
399. LeBlanc AD, Driscoll TB, Shackelford LC, Evans HJ, Rianon NJ, Smith SM, et al. Alendronate as an effective countermeasure to disuse induced bone loss. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002 Jun;2(4):335–43.
400. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Interventions to prevent bone loss in astronauts during space flight. *Keio J Med*. 2005;54(2):55–9.
401. Kohrt WM, Bloomfield SA, Little KD, Nelson ME, Yingling VR, American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine Position Stand: physical activity and bone health. *Med Sci Sports Exerc*. 2004 Nov;36(11):1985–96.
402. Rittweger J, Frost HM, Schiessl H, Ohshima H, Alkner B, Tesch P, et al. Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel resistive exercise and pamidronate: results from the LTBR study. *Bone*. 2005 Jun;36(6):1019–29.
403. Shackelford LC, LeBlanc AD, Driscoll TB, Evans HJ, Rianon NJ, Smith SM, et al. Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2004 Jul;97(1):119–29.
404. Baldwin KM, Haddad F, Pandorf CE, Roy RR, Edgerton VR. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front Physiol*. 2013 Oct 11;4:284.
405. Morey-Holton E, Globus RK, Kaplansky A, Durnova G. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv Space Biol Med*. 2005;10:7–40.
406. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol*. 2012 Apr;2(2):1143–211.

407. Cielen N, Maes K, Heulens N, Troosters T, Carmeliet G, Janssens W, et al. Interaction between Physical Activity and Smoking on Lung, Muscle, and Bone in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(5):674–82.
408. Kwon OS, Tanner RE, Barrows KM, Runtsch M, Symons JD, Jalili T, et al. MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015 Jul 1;309(1):E11–21.
409. O’keefe MP, Perez FR, Kinnick TR, Tischler ME, Henriksen EJ. Development of whole-body and skeletal muscle insulin resistance after one day of hindlimb suspension. *Metabolism*. 2004 Sep;53(9):1215–22.
410. Grenon SM, Saary J, Gray G, Vanderploeg JM, Hughes-Fulford M. Can I take a space flight? Considerations for doctors. *BMJ*. 2012 Dec 13;345:e8124.
411. Strollo F. Hormonal changes in humans during spaceflight. *Adv Space Biol Med*. 1999;7:99–129.
412. Riley DA, Bain JL, Thompson JL, Fitts RH, Widrick JJ, Trappe SW, et al. Decreased thin filament density and length in human atrophic soleus muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2000 Feb;88(2):567–72.
413. Bungo MW, Charles JB, Johnson PC. Cardiovascular deconditioning during space flight and the use of saline as a countermeasure to orthostatic intolerance. *Aviat Space Environ Med*. 1985 Oct;56(10):985–90.
414. Stein TP, Leskiw MJ, Schluter MD, Donaldson MR, Larina I. Protein kinetics during and after long-duration spaceflight on MIR. *Am J Physiol*. 1999 Jun;276(6 Pt 1):E1014–21.
415. Rambaut PC, Leach CS, Leonard JI. Observations in energy balance in man during spaceflight. *Am J Physiol*. 1977 Nov;233(5):R208–12.
416. Manzey D, Lorenz B. Mental performance during short-term and long-term spaceflight. *Brain Res Brain Res Rev*. 1998 Nov;28(1-2):215–21.
417. Strangman GE, Sipes W, Beven G. Human cognitive performance in spaceflight and analogue environments. *Aviat Space Environ Med*. 2014 Oct;85(10):1033–48.
418. Taylor GR, Konstantinova I, Sonnenfeld G, Jennings R. Changes in the immune system during and after spaceflight. *Adv Space Biol Med*. 1997;6:1–32.
419. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med*. 2008 Sep;79(9):835–43.
420. Crucian B, Stowe R, Mehta S, Uchakin P, Quiariarte H, Pierson D, et al. Immune system dysregulation occurs during short duration spaceflight on board the space shuttle. *J Clin Immunol*. 2013 Feb;33(2):456–65.
421. Blaber EA, Finkelstein H, Dvorochkin N, Sato KY, Yousuf R, Burns BP, et al. Microgravity Reduces the Differentiation and Regenerative Potential of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2015 Nov 15;24(22):2605–21.

422. Blaber E, Sato K, Almeida EAC. Stem cell health and tissue regeneration in microgravity. *Stem Cells Dev.* 2014 Dec;23 Suppl 1:73–8.
423. Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Microgravity tissue engineering. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1997 May;33(5):381–5.
424. Yuge L, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, et al. Cell differentiation and p38(MAPK) cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003 Feb;39(1-2):89–97.
425. Yuge L, Kajiume T, Tahara H, Kawahara Y, Umeda C, Yoshimoto R, et al. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem Cells Dev.* 2006 Dec;15(6):921–9.
426. Hirasaka K, Nikawa T, Yuge L, Ishihara I, Higashibata A, Ishioka N, et al. Clinorotation prevents differentiation of rat myoblastic L6 cells in association with reduced NF-kappa B signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Mar 22;1743(1-2):130–40.
427. Furukawa T, Tanimoto K, Fukazawa T, Imura T, Kawahara Y, Yuge L. Simulated microgravity attenuates myogenic differentiation via epigenetic regulations. *NPJ Microgravity.* 2018;4:11.
428. Castagnolo D, Piccolo C, Carotenuto L, Vergara A, Zagari A. Crystallization of the collagen-like polypeptide (PPG)10 aboard the International Space Station. 3. Analysis of residual acceleration-induced motion. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2003 Apr;59(Pt 4):773–6.
429. Jin F, Zhang Y, Xuan K, He D, Deng T, Tang L, et al. Establishment of three-dimensional tissue-engineered bone constructs under microgravity-simulated conditions. *Artif Organs.* 2010 Feb;34(2):118–25.
430. Li Y, He L, Pan S, Zhang L, Zhang W, Yi H, et al. Three-dimensional simulated microgravity culture improves the proliferation and odontogenic differentiation of dental pulp stem cell in PLGA scaffolds implanted in mice. *Mol Med Rep.* 2017 Feb;15(2):873–8.
431. Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res.* 2014 May;58(2-3):193–210.
432. Sorrells SF, Sapolsky RM. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun.* 2007 Mar;21(3):259–72.
433. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev.* 1984;5(1):25–44.
434. Keller SE, Weiss JM, Schleifer SJ, Miller NE, Stein M. Stress-induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. *Science.* 1983 Sep 23;221(4617):1301–4.
435. Heilig M, Koob GF, Ekman R, Britton KT. Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y: role in emotional integration. *Trends Neurosci.* 1994 Feb;17(2):80–5.
436. Irwin M, Hauger RL, Jones L, Provencio M, Britton KT. Sympathetic nervous system mediates central corticotropin-releasing factor induced suppression of natural killer cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 Oct;255(1):101–7.

437. Felten DL, Felten SY. Sympathetic noradrenergic innervation of immune organs. *Brain Behav Immun.* 1988 Dec;2(4):293–300.
438. Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev.* 1987 Dec;100:225–60.
439. Croiset G, Heijnen CJ, Veldhuis HD, de Wied D, Ballieux RE. Modulation of the immune response by emotional stress. *Life Sci.* 1987 Feb 23;40(8):775–82.
440. Song C, Dinan T, Leonard BE. Changes in immunoglobulin, complement and acute phase protein levels in the depressed patients and normal controls. *J Affect Disord.* 1994 Apr;30(4):283–8.
441. Viswanathan K, Dhabhar FS. Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 19;102(16):5808–13.
442. Herbert TB, Cohen S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom Med.* 1993 Aug;55(4):364–79.
443. Jensen MM. Changes in leukocyte counts associated with various stressors. *J Reticuloendothel Soc.* 1969 Dec;6(5):457–65.
444. Cunnick JE, Lysle DT, Armfield A, Rabin BS. Shock-induced modulation of lymphocyte responsiveness and natural killer activity: differential mechanisms of induction. *Brain Behav Immun.* 1988 Jun;2(2):102–13.
445. Khanfer R, Phillips AC, Carroll D, Lord JM. Altered human neutrophil function in response to acute psychological stress. *Psychosom Med.* 2010 Sep;72(7):636–40.
446. Khanfer R, Carroll D, Lord JM, Phillips AC. Reduced neutrophil superoxide production among healthy older adults in response to acute psychological stress. *Int J Psychophysiol Off J Int Organ Psychophysiol.* 2012 Dec;86(3):238–44.
447. Dhabhar FS, McEwen BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 2;96(3):1059–64.
448. Pace TWW, Mletzko TC, Alagbe O, Musselman DL, Nemeroff CB, Miller AH, et al. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *Am J Psychiatry.* 2006 Sep;163(9):1630–3.
449. Atanackovic D, Nowotny U, Freier E, Weber CS, Meyer S, Bartels K, et al. Acute psychological stress increases peripheral blood CD3+CD56+ natural killer T cells in healthy men: possible implications for the development and treatment of allergic and autoimmune disorders. *Stress Amst Neth.* 2013 Jul;16(4):421–8.
450. Al'Abadie MS, Kent GG, Gawkrödger DJ. The relationship between stress and the onset and exacerbation of psoriasis and other skin conditions. *Br J Dermatol.* 1994 Feb;130(2):199–203.
451. Amkraut AA, Solomon GF, Kraemer HC. Stress, early experience and adjuvant-induced arthritis in the rat. *Psychosom Med.* 1971 Jun;33(3):203–14.

452. Ackerman KD, Heyman R, Rabin BS, Anderson BP, Houck PR, Frank E, et al. Stressful life events precede exacerbations of multiple sclerosis. *Psychosom Med*. 2002 Dec;64(6):916–20.
453. Bonneau RH, Sheridan JF, Feng NG, Glaser R. Stress-induced effects on cell-mediated innate and adaptive memory components of the murine immune response to herpes simplex virus infection. *Brain Behav Immun*. 1991 Sep;5(3):274–95.
454. Cohen S, Frank E, Doyle WJ, Skoner DP, Rabin BS, Gwaltney JM. Types of stressors that increase susceptibility to the common cold in healthy adults. *Health Psychol Off J Div Health Psychol Am Psychol Assoc*. 1998 May;17(3):214–23.
455. Cohen S, Hamrick N, Rodriguez MS, Feldman PJ, Rabin BS, Manuck SB. Reactivity and vulnerability to stress-associated risk for upper respiratory illness. *Psychosom Med*. 2002 Apr;64(2):302–10.
456. Rozlog LA, Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Sheridan JF, Glaser R. Stress and immunity: implications for viral disease and wound healing. *J Periodontol*. 1999 Jul;70(7):786–92.
457. Rojas I-G, Padgett DA, Sheridan JF, Marucha PT. Stress-induced susceptibility to bacterial infection during cutaneous wound healing. *Brain Behav Immun*. 2002 Feb;16(1):74–84.
458. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 7;101(49):17312–5.
459. Sandi C. Memory Impairments Associated with Stress and Aging. In: Bermúdez-Rattoni F, editor. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging* [Internet]. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007 [cited 2019 Jul 3]. (Frontiers in Neuroscience). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3914/>
460. Andersen BL, Farrar WB, Golden-Kreutz D, Kutz LA, MacCallum R, Courtney ME, et al. Stress and immune responses after surgical treatment for regional breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jan 7;90(1):30–6.
461. Andersen BL, Farrar WB, Golden-Kreutz DM, Glaser R, Emery CF, Crespin TR, et al. Psychological, behavioral, and immune changes after a psychological intervention: a clinical trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004 Sep 1;22(17):3570–80.
462. Kiecolt-Glaser JK, Dura JR, Speicher CE, Trask OJ, Glaser R. Spousal caregivers of dementia victims: longitudinal changes in immunity and health. *Psychosom Med*. 1991 Aug;53(4):345–62.
463. Sgoutas-Emch SA, Cacioppo JT, Uchino BN, Malarkey W, Pearl D, Kiecolt-Glaser JK, et al. The effects of an acute psychological stressor on cardiovascular, endocrine, and cellular immune response: a prospective study of individuals high and low in heart rate reactivity. *Psychophysiology*. 1994 May;31(3):264–71.
464. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Stout JC, Tarr KL, Speicher CE, Holliday JE. Stress-related impairments in cellular immunity. *Psychiatry Res*. 1985 Nov;16(3):233–9.
465. Kiecolt-Glaser JK, Ricker D, George J, Messick G, Speicher CE, Garner W, et al. Urinary cortisol levels, cellular immunocompetency, and loneliness in psychiatric inpatients. *Psychosom Med*. 1984 Feb;46(1):15–23.



466. Kiecolt-Glaser JK, Fisher LD, Ogrocki P, Stout JC, Speicher CE, Glaser R. Marital quality, marital disruption, and immune function. *Psychosom Med*. 1987 Feb;49(1):13–34.
467. Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Chee M, Newton T, Cacioppo JT, Mao HY, et al. Negative behavior during marital conflict is associated with immunological down-regulation. *Psychosom Med*. 1993 Oct;55(5):395–409.
468. Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Gravenstein S, Malarkey WB, Sheridan J. Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 2;93(7):3043–7.
469. Glaser R, Kennedy S, Lafuse WP, Bonneau RH, Speicher C, Hillhouse J, et al. Psychological stress-induced modulation of interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 production in peripheral blood leukocytes. *Arch Gen Psychiatry*. 1990 Aug;47(8):707–12.
470. Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med*. 2006 Aug;12(8):939–44.
471. Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull*. 2004 Jul;130(4):601–30.
472. Marshall GD, Agarwal SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger EM, Morris GJ. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav Immun*. 1998 Dec;12(4):297–307.
473. Glaser R, Sheridan J, Malarkey WB, MacCallum RC, Kiecolt-Glaser JK. Chronic stress modulates the immune response to a pneumococcal pneumonia vaccine. *Psychosom Med*. 2000 Dec;62(6):804–7.
474. Kiecolt-Glaser JK, Loving TJ, Stowell JR, Malarkey WB, Lemeshow S, Dickinson SL, et al. Hostile marital interactions, proinflammatory cytokine production, and wound healing. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Dec;62(12):1377–84.
475. McGuire L, Heffner K, Glaser R, Needleman B, Malarkey W, Dickinson S, et al. Pain and wound healing in surgical patients. *Ann Behav Med Publ Soc Behav Med*. 2006 Apr;31(2):165–72.
476. Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Malarkey WB, Mercado AM, Glaser R. Slowing of wound healing by psychological stress. *Lancet Lond Engl*. 1995 Nov 4;346(8984):1194–6.
477. Glaser R, Thorn BE, Tarr KL, Kiecolt-Glaser JK, D’Ambrosio SM. Effects of stress on methyltransferase synthesis: an important DNA repair enzyme. *Health Psychol Off J Div Health Psychol Am Psychol Assoc*. 1985;4(5):403–12.
478. Kiecolt-Glaser JK, Stephens RE, Lipetz PD, Speicher CE, Glaser R. Distress and DNA repair in human lymphocytes. *J Behav Med*. 1985 Dec;8(4):311–20.
479. Bonneau RH, Sheridan JF, Feng NG, Glaser R. Stress-induced suppression of herpes simplex virus (HSV)-specific cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell activity and enhancement of acute pathogenesis following local HSV infection. *Brain Behav Immun*. 1991 Jun;5(2):170–92.
480. Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher C, Penn GM, Holliday J, Glaser R. Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom Med*. 1984 Feb;46(1):7–14.

481. Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Strain EC, Stout JC, Tarr KL, Holliday JE, et al. Modulation of cellular immunity in medical students. *J Behav Med.* 1986 Feb;9(1):5–21.
482. Glaser R, Rice J, Speicher CE, Stout JC, Kiecolt-Glaser JK. Stress depresses interferon production by leukocytes concomitant with a decrease in natural killer cell activity. *Behav Neurosci.* 1986 Oct;100(5):675–8.
483. Irwin M, Brown M, Patterson T, Hauger R, Mascovich A, Grant I. Neuropeptide Y and natural killer cell activity: findings in depression and Alzheimer caregiver stress. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1991 Dec;5(15):3100–7.
484. Irwin M, Lacher U, Caldwell C. Depression and reduced natural killer cytotoxicity: a longitudinal study of depressed patients and control subjects. *Psychol Med.* 1992 Nov;22(4):1045–50.
485. Yang EV, Sood AK, Chen M, Li Y, Eubank TD, Marsh CB, et al. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res.* 2006 Nov 1;66(21):10357–64.
486. Sood AK, Bhatti R, Kamat AA, Landen CN, Han L, Thaker PH, et al. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006 Jan 15;12(2):369–75.
487. Cacioppo JT, Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Laskowski BF, Rozlog LA, Poehlmann KM, et al. Autonomic and glucocorticoid associations with the steady-state expression of latent Epstein-Barr virus. *Horm Behav.* 2002 Aug;42(1):32–41.
488. Glaser R, Kutz LA, MacCallum RC, Malarkey WB. Hormonal modulation of Epstein-Barr virus replication. *Neuroendocrinology.* 1995 Oct;62(4):356–61.
489. Kusnecov AV, Grota LJ, Schmidt SG, Bonneau RH, Sheridan JF, Glaser R, et al. Decreased herpes simplex viral immunity and enhanced pathogenesis following stressor administration in mice. *J Neuroimmunol.* 1992 May;38(1-2):129–37.
490. Padgett DA, Sheridan JF, Dorne J, Berntson GG, Candelora J, Glaser R. Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9;95(12):7231–5.
491. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Chronic stress modulates the virus-specific immune response to latent herpes simplex virus type 1. *Ann Behav Med Publ Soc Behav Med.* 1997;19(2):78–82.
492. Kiecolt-Glaser JK, Kennedy S, Malkoff S, Fisher L, Speicher CE, Glaser R. Marital discord and immunity in males. *Psychosom Med.* 1988 Jun;50(3):213–29.
493. Glaser R, Rice J, Sheridan J, Fertel R, Stout J, Speicher C, et al. Stress-related immune suppression: health implications. *Brain Behav Immun.* 1987 Mar;1(1):7–20.
494. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Speicher CE, Holliday JE. Stress, loneliness, and changes in herpesvirus latency. *J Behav Med.* 1985 Sep;8(3):249–60.
495. Larson SJ, Dunn AJ. Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun.* 2001 Dec;15(4):371–87.

496. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):46–56.
497. Black PH. The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain Behav Immun*. 2003 Oct;17(5):350–64.
498. Zalcman SS, Siegel A. The neurobiology of aggression and rage: role of cytokines. *Brain Behav Immun*. 2006 Nov;20(6):507–14.
499. Koolhaas JM. Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain Behav Immun*. 2008 Jul;22(5):662–7.
500. Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis*. 2009 Mar;24(1):27–53.
501. Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, et al. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*. 2015 Aug 6;300:141–54.
502. Hodes GE, Kana V, Menard C, Merad M, Russo SJ. Neuroimmune mechanisms of depression. *Nat Neurosci*. 2015 Oct;18(10):1386–93.
503. Pfau ML, Russo SJ. Peripheral and Central Mechanisms of Stress Resilience. *Neurobiol Stress*. 2015 Jan 1;1:66–79.
504. Menard C, Pfau ML, Hodes GE, Kana V, Wang VX, Bouchard S, et al. Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. *Nat Neurosci*. 2017 Dec;20(12):1752–60.
505. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci*. 1995 Feb;18(2):83–8.
506. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):629–40.
507. Blalock JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev*. 1989 Jan;69(1):1–32.
508. Janković BD. Neuroimmunomodulation: facts and dilemmas. *Immunol Lett*. 1989 May;21(2):101–18.
509. 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 Feb;155(2):463–74.
510. Miller AH, Spencer RL, Pearce BD, Pisell TL, Azrieli Y, Tanapat P, et al. Glucocorticoid Receptors Are Differentially Expressed in the Cells and Tissues of the Immune System. *Cell Immunol*. 1998 May;186(1):45–54.
511. Dantzer R, Kelley KW. Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci*. 1989;44(26):1995–2008.

512. Kiecolt-Glaser JK, Cacioppo JT, Malarkey WB, Glaser R. Acute psychological stressors and short-term immune changes: what, why, for whom, and to what extent? *Psychosom Med.* 1992 Dec;54(6):680–5.
513. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000 Dec;52(4):595–638.
514. Tan KS, Nackley AG, Satterfield K, Maixner W, Diatchenko L, Flood PM. Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cell Signal.* 2007 Feb;19(2):251–60.
515. Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, et al. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 18;100(4):1920–5.
516. Chelmicka-Schorr E, Arnason BG. Nervous system-immune system interactions. *Res Publ - Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1990;68:67–90.
517. Del Rey A, Besedovsky HO. Sympathetic nervous system-immune interactions in autoimmune lymphoproliferative diseases. *Neuroimmunomodulation.* 2008;15(1):29–36.
518. Wu L, Tai Y, Hu S, Zhang M, Wang R, Zhou W, et al. Bidirectional Role of  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor in Autoimmune Diseases. *Front Pharmacol.* 2018;9:1313.
519. Shahabi S, Hassan ZM, Jazani NH, Ebtekar M. Sympathetic nervous system plays an important role in the relationship between immune mediated diseases. *Med Hypotheses.* 2006;67(4):900–3.
520. Frieri M. Neuroimmunology and inflammation: implications for therapy of allergic and autoimmune diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol.* 2003 Jun;90(6 Suppl 3):34–40.
521. Glaser R, Mehl VS, Penn G, Speicher CE, Kiecolt-Glaser JK. Stress-associated changes in plasma immunoglobulin levels. *Int J Psychosom Off Publ Int Psychosom Inst.* 1986;33(2):41–2.
522. Glaser R, Pearson GR, Bonneau RH, Esterling BA, Atkinson C, Kiecolt-Glaser JK. Stress and the memory T-cell response to the Epstein-Barr virus in healthy medical students. *Health Psychol Off J Div Health Psychol Am Psychol Assoc.* 1993 Nov;12(6):435–42.
523. Dobbs CM, Vasquez M, Glaser R, Sheridan JF. Mechanisms of stress-induced modulation of viral pathogenesis and immunity. *J Neuroimmunol.* 1993 Dec;48(2):151–60.
524. Bonneau RH, Sheridan JF, Feng N, Glaser R. Stress-induced modulation of the primary cellular immune response to herpes simplex virus infection is mediated by both adrenal-dependent and independent mechanisms. *J Neuroimmunol.* 1993 Feb;42(2):167–76.
525. Calcagni E, Elenkov I. Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Jun;1069:62–76.
526. Kang DH, Fox C. Th1 and Th2 cytokine responses to academic stress. *Res Nurs Health.* 2001 Aug;24(4):245–57.

527. Franchimont D, Galon J, Gadina M, Visconti R, Zhou Y, Aringer M, et al. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Feb 15;164(4):1768–74.
528. Hu X, Li W-P, Meng C, Ivashkiv LB. Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 May 1;170(9):4833–9.
529. Steer JH, Kroeger KM, Abraham LJ, Joyce DA. Glucocorticoids suppress tumor necrosis factor-alpha expression by human monocytic THP-1 cells by suppressing transactivation through adjacent NF-kappa B and c-Jun-activating transcription factor-2 binding sites in the promoter. *J Biol Chem*. 2000 Jun 16;275(24):18432–40.
530. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 1992 Mar 4;267(9):1244–52.
531. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Jun;966:290–303.
532. Mozo L, Suárez A, Gutiérrez C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2004 Mar;34(3):406–12.
533. Wu CY, Fargeas C, Nakajima T, Delespesse G. Glucocorticoids suppress the production of interleukin 4 by human lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1991 Oct;21(10):2645–7.
534. Lew W, Oppenheim JJ, Matsushima K. Analysis of the suppression of IL-1 alpha and IL-1 beta production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1988 Mar 15;140(6):1895–902.
535. Angeli A, Masera RG, Sartori ML, Fortunati N, Racca S, Dovio A, et al. Modulation by cytokines of glucocorticoid action. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 22;876:210–20.
536. Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 22;100(15):9090–5.
537. Graham JE, Robles TF, Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Bissell MG, Glaser R. Hostility and pain are related to inflammation in older adults. *Brain Behav Immun*. 2006 Jul;20(4):389–400.
538. Glaser R, Robles TF, Sheridan J, Malarkey WB, Kiecolt-Glaser JK. Mild depressive symptoms are associated with amplified and prolonged inflammatory responses after influenza virus vaccination in older adults. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 Oct;60(10):1009–14.
539. Maes M, Bosmans E, De Jongh R, Kenis G, Vandoolaeghe E, Neels H. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine*. 1997 Nov;9(11):853–8.
540. Dhabhar FS. Psychological stress and immunoprotection versus immunopathology in the skin. *Clin Dermatol*. 2013 Feb;31(1):18–30.
541. Dhabhar FS. Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection versus Immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol Off J Can Soc Allergy Clin Immunol*. 2008 Mar 15;4(1):2–11.

542. Kleyn CE, Schneider L, Saraceno R, Mantovani C, Richards HL, Fortune DG, et al. The effects of acute social stress on epidermal Langerhans' cell frequency and expression of cutaneous neuropeptides. *J Invest Dermatol*. 2008 May;128(5):1273–9.
543. Viswanathan K, Daugherty C, Dhabhar FS. Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. *Int Immunol*. 2005 Aug;17(8):1059–69.
544. Saint-Mezard P, Chavagnac C, Bosset S, Ionescu M, Peyron E, Kaiserlian D, et al. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Oct 15;171(8):4073–80.
545. Seiffert K, Granstein RD. Neuroendocrine regulation of skin dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Nov;1088:195–206.
546. Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L, et al. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest*. 1997 Sep 15;100(6):1513–9.
547. Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians*. 1996 Sep;108(5):374–81.
548. Elenkov IJ, Chrousos GP, Wilder RL. Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:94–105.
549. Seiffert K, Hosoi J, Torii H, Ozawa H, Ding W, Campton K, et al. Catecholamines inhibit the antigen-presenting capability of epidermal Langerhans cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Jun 15;168(12):6128–35.
550. Maestroni GJM. Short exposure of maturing, bone marrow-derived dendritic cells to norepinephrine: impact on kinetics of cytokine production and Th development. *J Neuroimmunol*. 2002 Aug;129(1-2):106–14.
551. Abe M, Thomson AW. Influence of immunosuppressive drugs on dendritic cells. *Transpl Immunol*. 2003 Sep;11(3-4):357–65.
552. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress system--organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation*. 2006;13(5-6):257–67.
553. Shodell M, Siegal FP. Corticosteroids depress IFN-alpha-producing plasmacytoid dendritic cells in human blood. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Sep;108(3):446–8.
554. Ashworth J, Booker J, Breathnach SM. Effects of topical corticosteroid therapy on Langerhans cell antigen presenting function in human skin. *Br J Dermatol*. 1988 Apr;118(4):457–69.
555. Furue M, Katz SI. Direct effects of glucocorticosteroids on epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol*. 1989 Mar;92(3):342–7.
556. Halliday GM, Knight BA, Muller HK. Reduction in murine Langerhans cell ATPase staining following topical but not systemic treatment with steroid and non-steroid immunosuppressants. *Br J Dermatol*. 1986 Jan;114(1):83–9.

557. Abe M, Thomson AW. Dexamethasone preferentially suppresses plasmacytoid dendritic cell differentiation and enhances their apoptotic death. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2006 Mar;118(2-3):300–6.
558. Moser M, De Smedt T, Sornasse T, Tielemans F, Chentoufi AA, Muraille E, et al. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol.* 1995 Oct;25(10):2818–24.
559. Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. Inhibition by dexamethasone of Langerhans cell migration: influence of epidermal cytokine signals. *Immunopharmacology.* 1999 Apr;41(3):235–43.
560. Pan J, Ju D, Wang Q, Zhang M, Xia D, Zhang L, et al. Dexamethasone inhibits the antigen presentation of dendritic cells in MHC class II pathway. *Immunol Lett.* 2001 Apr 2;76(3):153–61.
561. Matasić R, Dietz AB, Vuk-Pavlović S. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *J Leukoc Biol.* 1999 Dec;66(6):909–14.
562. Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Jun;1024:124–37.
563. Matyszak MK, Citterio S, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 2000 Apr;30(4):1233–42.
564. Matsue H, Yang C, Matsue K, Edelbaum D, Mummert M, Takashima A. Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporin A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2002 Oct 1;169(7):3555–64.
565. Salgado CG, Nakamura K, Sugaya M, Tada Y, Asahina A, Fukuda S, et al. Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells<sup>1</sup>. *J Invest Dermatol.* 1999 Dec;113(6):1021–7.
566. Hoetzenecker W, Meingassner JG, Ecker R, Stingl G, Stuetz A, Elbe-Bürger A. Corticosteroids but not pimecrolimus affect viability, maturation and immune function of murine epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 2004 Mar;122(3):673–84.
567. Bascove M, Guéguinou N, Schaerlinger B, Gauquelin-Koch G, Fripiat J-P. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2011 Sep;25(9):2947–55.
568. Huin-Schohn C, Guéguinou N, Schenten V, Bascove M, Koch GG, Baatout S, et al. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2013 Jan;27(1):333–41.
569. Ghislin S, Ouzren-Zarhloul N, Kaminski S, Fripiat J-P. Hypergravity exposure during gestation modifies the TCR $\beta$  repertoire of newborn mice. *Sci Rep.* 2015;5:9318.

570. Lescale C, Schenten V, Djegloul 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 Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2015 Feb;29(2):455–63.
571. Talas M, Batkai L, Stoger I, Nagy K, Hiros L, Konstantinova I, et al. Results of space experiment program “Interferon.” *Acta Astronaut.* 1984 Aug;11(7-8):379–86.
572. Crucian B, Johnston S, Mehta S, Stowe R, Uchakin P, Quiariarte H, et al. A case of persistent skin rash and rhinitis with immune system dysregulation onboard the International Space Station. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016 Aug;4(4):759–62.e8.
573. 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.
574. Meehan RT, Neale LS, Kraus ET, Stuart CA, Smith ML, Cintron NM, et al. Alteration in human mononuclear leucocytes following space flight. *Immunology.* 1992 Jul;76(3):491–7.
575. Konstantinova IV, Rykova MP, Lesnyak AT, Antropova EA. Immune changes during long-duration missions. *J Leukoc Biol.* 1993 Sep;54(3):189–201.
576. Meshkov D, Rykova M. The natural cytotoxicity in cosmonauts on board space stations. *Acta Astronaut.* 1995 Dec;36(8-12):719–26.
577. Gmünder FK, Konstantinova I, Cogoli A, Lesnyak A, Bogomolov W, Grachov AW. Cellular immunity in cosmonauts during long duration spaceflight on board the orbital MIR station. *Aviat Space Environ Med.* 1994 May;65(5):419–23.
578. Taylor GR, Janney RP. In vivo testing confirms a blunting of the human cell-mediated immune mechanism during space flight. *J Leukoc Biol.* 1992 Feb;51(2):129–32.
579. Taylor GR. Immune changes during short-duration missions. *J Leukoc Biol.* 1993 Sep;54(3):202–8.
580. Kimzey S. Biomedical Results from Skylab. NASA; 1977.
581. Stowe RP, Pierson DL, Feedback DL, Barrett AD. Stress-induced reactivation of Epstein-Barr virus in astronauts. *Neuroimmunomodulation.* 2000;8(2):51–8.
582. Crucian B, Stowe RP, Mehta S, Quiariarte H, Pierson D, Sams C. Alterations in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight. *NPJ Microgravity.* 2015;1:15013.
583. Crucian BE, Zwart SR, Mehta S, Uchakin P, Quiariarte HD, Pierson D, et al. Plasma cytokine concentrations indicate that in vivo hormonal regulation of immunity is altered during long-duration spaceflight. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* 2014 Oct;34(10):778–86.
584. Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, Bueb J-L, 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 Nov;86(5):1027–38.
585. Crucian B, Sams C. Immune system dysregulation during spaceflight: clinical risk for exploration-class missions. *J Leukoc Biol.* 2009 Nov;86(5):1017–8.



586. Meehan R, Whitson P, Sams C. The role of psychoneuroendocrine factors on spaceflight-induced immunological alterations. *J Leukoc Biol.* 1993 Sep;54(3):236–44.
587. Taylor GR. Overview of spaceflight immunology studies. *J Leukoc Biol.* 1993 Sep;54(3):179–88.
588. Crucian B, Simpson RJ, Mehta S, Stowe R, Chouker A, Hwang S-A, et al. Terrestrial stress analogs for spaceflight associated immune system dysregulation. *Brain Behav Immun.* 2014 Jul;39:23–32.
589. Konstantinova IV, Fuchs BB. The immune system in space and other extreme conditions. Reading, Berkshire, U.K. ; Philadelphia, Pa., U.S.A: Harwood Academic Publishers; 1991. 258 p. (Soviet medical reviews).
590. Sonnenfeld G, Miller ES. The role of cytokines in immune changes induced by spaceflight. *J Leukoc Biol.* 1993 Sep;54(3):253–8.
591. Sonnenfeld G. The immune system in space and microgravity. *Med Sci Sports Exerc.* 2002 Dec;34(12):2021–7.
592. Csaba G. Hormesis and immunity: A review. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2019 Jun 1;66(2):155–68.
593. Monzen S, Yoshino H, Kasai-Eguchi K, Kashiwakura I. Characteristics of myeloid differentiation and maturation pathway derived from human hematopoietic stem cells exposed to different linear energy transfer radiation types. *PLoS One.* 2013;8(3):e59385.
594. Krukowski K, Grue K, Frias ES, Pietrykowski J, Jones T, Nelson G, et al. Female mice are protected from space radiation-induced maladaptive responses. *Brain Behav Immun.* 2018;74:106–20.
595. Raber J, Yamazaki J, Torres ERS, Kirchoff N, Stagaman K, Sharpton T, et al. Combined Effects of Three High-Energy Charged Particle Beams Important for Space Flight on Brain, Behavioral and Cognitive Endpoints in B6D2F1 Female and Male Mice. *Front Physiol.* 2019;10:179.
596. Li C-Y, Liao M-H, Lin C-W, Tsai W-S, Huang C-C, Tang T-K. Inhibitory Effects of Microwave Radiation on LPS-Induced NFκB Expression in THP-1 Monocytes. *Chin J Physiol.* 2012 Dec 31;55(6):421–7.
597. Fukuda T, Fukuda K, Takahashi A, Ohnishi T, Nakano T, Sato M, et al. Analysis of deletion mutations of the rpsL gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* detected after long-term flight on the Russian space station Mir. *Mutat Res.* 2000 Oct 31;470(2):125–32.
598. McCoy KB, Derecho I, Wong T, Tran HM, Huynh TD, La Duc MT, et al. Insights into the extremotolerance of *Acinetobacter radioresistens* 50v1, a gram-negative bacterium isolated from the Mars Odyssey spacecraft. *Astrobiology.* 2012 Sep;12(9):854–62.
599. Beblo K, Rabbow E, Rachel R, Huber H, Rettberg P. Tolerance of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms to desiccation. *Extrem Life Extreme Cond.* 2009 May;13(3):521–31.
600. Middleton SS, Latmani RB, Mackey MR, Ellisman MH, Tebo BM, Criddle CS. Cometabolism of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis* MR-1 produces cell-associated reduced chromium and inhibits growth. *Biotechnol Bioeng.* 2003 Sep 20;83(6):627–37.

601. Ranawat P, Rawat S. Radiation resistance in thermophiles: mechanisms and applications. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017 Jun;33(6):112.
602. Daly MJ. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(3):237–45.
603. Horneck G, Bucker H, Reitz G. Long-term survival of bacterial spores in space. *Adv Space Res Off J Comm Space Res COSPAR.* 1994 Oct;14(10):41–5.
604. Nicholson WL, Fajardo-Cavazos P, Rebeil R, Slieman TA, Riesenman PJ, Law JF, et al. Bacterial endospores and their significance in stress resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002 Aug;81(1-4):27–32.
605. Riesenman PJ, Nicholson WL. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Feb;66(2):620–6.
606. Schmitt DA, Schaffar L. Isolation and confinement as a model for spaceflight immune changes. *J Leukoc Biol.* 1993 Sep;54(3):209–13.
607. Cosman BC, Brandt-Rauf PW. Infectious disease in Antarctica and its relation to aerospace medicine: a review. *Aviat Space Environ Med.* 1987 Feb;58(2):174–9.
608. Feuerecker M, Crucian BE, Quintens R, Buchheim J-I, Salam AP, Rybka A, et al. Immune sensitization during 1 year in the Antarctic high-altitude Concordia Environment. *Allergy.* 2019 Jan;74(1):64–77.
609. Feuerecker M, Mayer W, Kaufmann I, Gruber M, Muckenthaler F, Yi B, et al. A corticoid-sensitive cytokine release assay for monitoring stress-mediated immune modulation. *Clin Exp Immunol.* 2013 May;172(2):290–9.
610. Mehta SK, Pierson DL, Cooley H, Dubow R, Lugg D. Epstein-Barr virus reactivation associated with diminished cell-mediated immunity in antarctic expeditioners. *J Med Virol.* 2000 Jun;61(2):235–40.
611. Tingate TR, Lugg DJ, Muller HK, Stowe RP, Pierson DL. Antarctic isolation: immune and viral studies. *Immunol Cell Biol.* 1997 Jun;75(3):275–83.
612. Lugg D, Shepanek M. Space analogue studies in Antarctica. *Acta Astronaut.* 1999 Jun;44(7-12):693–9.
613. Glaser R, Pearson GR, Jones JF, Hillhouse J, Kennedy S, Mao HY, et al. Stress-related activation of Epstein-Barr virus. *Brain Behav Immun.* 1991 Jun;5(2):219–32.
614. Strewe C, Crucian BE, Sams CF, Feuerecker B, Stowe RP, Choukèr A, et al. Hyperbaric hyperoxia alters innate immune functional properties during NASA Extreme Environment Mission Operation (NEEMO). *Brain Behav Immun.* 2015 Nov;50:52–7.
615. Zwart SR, Kala G, Smith SM. Body iron stores and oxidative damage in humans increased during and after a 10- to 12-day undersea dive. *J Nutr.* 2009 Jan;139(1):90–5.

616. Gridley DS, Pecaut MJ, Green LM, Miller GM, Nelson GA. Hypergravity-induced immunomodulation in a rodent model: lymphocytes and lymphoid organs. *J Gravitational Physiol J Int Soc Gravitational Physiol*. 2002 Dec;9(2):15–27.
617. Goldstein O, Ishay JS. The white blood cell line: changes induced in mice by hypergravity. *Adv Space Res Off J Comm Space Res COSPAR*. 1998;21(8-9):1333–43.
618. 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 Jan;37(1):137–47.
619. Jang TY, Jung A-Y, Kim YH. Hormetic Effect of Chronic Hypergravity in a Mouse Model of Allergic Asthma and Rhinitis. *Sci Rep*. 2016 02;6:27260.
620. Jang TY, Kim K-S, Park C-S, Lim J, Huh K-C, Heo M-J, et al. Exposure to hypergravity increases serum interleukin-5 and pulmonary infiltration in mice with allergic asthma. *Cent-Eur J Immunol*. 2014;39(4):434–40.
621. Galimberti M, Tolić-Nørrelykke IM, Favillini R, Mercatelli R, Annunziato F, Cosmi L, et al. Hypergravity speeds up the development of T-lymphocyte motility. *Eur Biophys J EBJ*. 2006 May;35(5):393–400.
622. Adrian A, Schoppmann K, Sromicki J, Brungs S, von der Wiesche M, Hock B, et al. The oxidative burst reaction in mammalian cells depends on gravity. *Cell Commun Signal CCS*. 2013 Dec 20;11:98.
623. Nickerson CA, Ott CM, Wilson JW, Ramamurthy R, Pierson DL. Microbial responses to microgravity and other low-shear environments. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2004 Jun;68(2):345–61.
624. Kacena MA, Merrell GA, Manfredi B, Smith EE, Klaus DM, Todd P. Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999 Feb;51(2):229–34.
625. Zea L, Larsen M, Estante F, Qvortrup K, Moeller R, Dias de Oliveira S, et al. Phenotypic Changes Exhibited by *E. coli* Cultured in Space. *Front Microbiol*. 2017;8:1598.
626. Klaus D, Simske S, Todd P, Stodieck L. Investigation of space flight effects on *Escherichia coli* and a proposed model of underlying physical mechanisms. *Microbiol Read Engl*. 1997 Feb;143 ( Pt 2):449–55.
627. Wilson JW, Ott CM, Höner zu Bentrup K, Ramamurthy R, Quick L, Porwollik S, et al. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 9;104(41):16299–304.
628. Chopra V, Fadl AA, Sha J, Chopra S, Galindo CL, Chopra AK. Alterations in the virulence potential of enteric pathogens and bacterial-host cell interactions under simulated microgravity conditions. *J Toxicol Environ Health A*. 2006 Jul;69(14):1345–70.
629. Lapchine L, Moatti N, Gasset G, Richoilley G, Templier J, Tixador R. Antibiotic activity in space. *Drugs Exp Clin Res*. 1986;12(12):933–8.

630. Tixador R, Richoilley G, Gasset G, Planel H, Moatti N, Lapchine L, et al. Preliminary results of Cytos 2 experiment. *Acta Astronaut.* 1985 Feb;12(2):131–4.
631. Klaus DM, Howard HN. Antibiotic efficacy and microbial virulence during space flight. *Trends Biotechnol.* 2006 Mar;24(3):131–6.
632. Tixador R, Richoilley G, Gasset G, Templier J, Bes JC, Moatti N, et al. Study of minimal inhibitory concentration of antibiotics on bacteria cultivated in vitro in space (Cytos 2 experiment). *Aviat Space Environ Med.* 1985 Aug;56(8):748–51.
633. Lencner AA, Lencner CP, Mikelsaar ME, Tjuri ME, Toom MA, Väljaots ME, et al. [The quantitative composition of the intestinal lactoflora before and after space flights of different lengths]. *Nahr.* 1984;28(6-7):607–13.
634. Decelle JG, Taylor GR. Autoflora in the upper respiratory tract of Apollo astronauts. *Appl Environ Microbiol.* 1976 Nov;32(5):659–65.
635. Brown LR, Fromme WJ, Handler SF, Wheatcroft MG, Johnston DA. Effect of Skylab missions on clinical and microbiologic aspects of oral health. *J Am Dent Assoc* 1939. 1976 Aug;93(2):357–63.
636. Ližko NN, Silov VM, Syrych GD. [Events in the development of dysbacteriosis of the intestines in man under extreme conditions]. *Nahr.* 1984;28(6-7):599–605.
637. Nefedov YG, Shilov VM, Konstantinova IV, Zaloguyev SN. Microbiological and immunological aspects of extended manned space flights. *Life Sci Space Res.* 1971;9:11–6.
638. Searles SC, Woolley CM, Petersen RA, Hyman LE, Nielsen-Preiss SM. Modeled microgravity increases filamentation, biofilm formation, phenotypic switching, and antimicrobial resistance in *Candida albicans*. *Astrobiology.* 2011 Oct;11(8):825–36.
639. Castro SL, Nelman-Gonzalez M, Nickerson CA, Ott CM. Induction of attachment-independent biofilm formation and repression of Hfq expression by low-fluid-shear culture of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Sep;77(18):6368–78.
640. Crabbé A, Pycke B, Van Houdt R, Monsieurs P, Nickerson C, Leys N, et al. Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to low shear modelled microgravity involves AlgU regulation. *Environ Microbiol.* 2010 Jun;12(6):1545–64.
641. Lynch SV, Mukundakrishnan K, Benoit MR, Ayyaswamy PS, Matin A. *Escherichia coli* biofilms formed under low-shear modeled microgravity in a ground-based system. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Dec;72(12):7701–10.
642. Tucker DL, Ott CM, Huff S, Fofanov Y, Pierson DL, Willson RC, et al. Characterization of *Escherichia coli* MG1655 grown in a low-shear modeled microgravity environment. *BMC Microbiol.* 2007 Mar 7;7:15.
643. Orsini SS, Lewis AM, Rice KC. Investigation of simulated microgravity effects on *Streptococcus mutans* physiology and global gene expression. *NPJ Microgravity.* 2017;3:4.
644. Altenburg SD, Nielsen-Preiss SM, Hyman LE. Increased filamentous growth of *Candida albicans* in simulated microgravity. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2008 Mar;6(1):42–50.

645. Novikova ND. Review of the knowledge of microbial contamination of the Russian manned spacecraft. *Microb Ecol.* 2004 Feb;47(2):127–32.
646. Ott CM, Bruce RJ, Pierson DL. Microbial characterization of free floating condensate aboard the Mir space station. *Microb Ecol.* 2004 Feb;47(2):133–6.
647. Song B, Leff LG. Identification and characterization of bacterial isolates from the Mir space station. *Microbiol Res.* 2005;160(2):111–7.
648. Costerton JW. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol.* 2001 Feb;9(2):50–2.
649. Hall MR, McGillicuddy E, Kaplan LJ. Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians. *Surg Infect.* 2014 Feb;15(1):1–7.
650. Taylor PW, Sommer AP. Towards rational treatment of bacterial infections during extended space travel. *Int J Antimicrob Agents.* 2005 Sep;26(3):183–7.
651. Cogoli A. Space flight and the immune system. *Vaccine.* 1993;11(5):496–503.
652. Stowe RP, Sams CF, Mehta SK, Kaur I, Jones ML, Feeback DL, et al. Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J Leukoc Biol.* 1999 Feb;65(2):179–86.
653. Kaur I, Simons ER, Castro VA, Mark Ott C, Pierson DL. Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain Behav Immun.* 2004 Sep;18(5):443–50.
654. Mills PJ, Meck JV, Waters WW, D'Aunno D, Ziegler MG. Peripheral leukocyte subpopulations and catecholamine levels in astronauts as a function of mission duration. *Psychosom Med.* 2001 Dec;63(6):886–90.
655. Meloni MA, Galleri G, Pani G, Saba A, Pippia P, Cogoli-Greuter M. Space flight affects motility and cytoskeletal structures in human monocyte cell line J-111. *Cytoskelet Hoboken NJ.* 2011 Feb;68(2):125–37.
656. Verhaar AP, Hoekstra E, Tjon ASW, Utomo WK, Deuring JJ, Bakker ERM, et al. Dichotomous effect of space flight-associated microgravity on stress-activated protein kinases in innate immunity. *Sci Rep.* 2014 Jun 27;4:5468.
657. Lewis ML, Reynolds JL, Cubano LA, Hatton JP, Lawless BD, Piepmeier EH. Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1998 Aug;12(11):1007–18.
658. Girardi C, De Pittà C, Casara S, Calura E, Romualdi C, Celotti L, et al. Integration analysis of microRNA and mRNA expression profiles in human peripheral blood lymphocytes cultured in modeled microgravity. *BioMed Res Int.* 2014;2014:296747.
659. Sanzari JK, Romero-Weaver AL, James G, Krigsfeld G, Lin L, Diffenderfer ES, et al. Leukocyte activity is altered in a ground based murine model of microgravity and proton radiation exposure. *PLoS One.* 2013;8(8):e71757.
660. Cogoli A, Tschopp A, Fuchs-Bislin P. Cell sensitivity to gravity. *Science.* 1984 Jul 13;225(4658):228–30.

661. Cogoli A. The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system. *J Leukoc Biol.* 1993 Sep;54(3):259–68.
662. Cogoli A. The effect of space flight on human cellular immunity. *Environ Med Annu Rep Res Inst Environ Med Nagoya Univ.* 1993;37(2):107–16.
663. Gaignier F, Schenten V, De Carvalho Bittencourt M, Gauquelin-Koch G, Fripiat J-P, 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(3):e92664.
664. Gridley DS, Slater JM, Luo-Owen X, Rizvi A, Chapes SK, Stodieck LS, et al. Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2009 Jan;106(1):194–202.
665. Luo H, Wang C, Feng M, Zhao Y. Microgravity inhibits resting T cell immunity in an exposure time-dependent manner. *Int J Med Sci.* 2014;11(1):87–96.
666. Walther I, Pippia P, Meloni MA, Turrini F, Mannu F, Cogoli A. Simulated microgravity inhibits the genetic expression of interleukin-2 and its receptor in mitogen-activated T lymphocytes. *FEBS Lett.* 1998 Sep 25;436(1):115–8.
667. Hashemi BB, Penkala JE, Vens C, Huls H, Cubbage M, Sams CF. T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and in spaceflight. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1999 Nov;13(14):2071–82.
668. Sonnenfeld G, Davis S, Taylor GR, Mandel AD, Konstantinova IV, Lesnyak A, et al. Effect of space flight on cytokine production and other immunologic parameters of rhesus monkeys. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* 1996 May;16(5):409–15.
669. McCarville JL, Clarke ST, Shastri P, Liu Y, Kalmokoff M, Brooks SPJ, et al. Spaceflight influences both mucosal and peripheral cytokine production in PTN-Tg and wild type mice. *PLoS One.* 2013;8(7):e68961.
670. Boonyaratanakornkit JB, Cogoli A, Li C-F, Schopper T, Pippia P, Galleri G, et al. Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2005 Dec;19(14):2020–2.
671. Monici M, Basile V, Bellik L, Fusi F, Marziliano N, Parenti A, et al. Does the exposure to microgravity affect dendritic cell maturation from monocytes? *Microgravity Sci Technol.* 2007 Sep;19(5-6):187–90.
672. Low EK, Brudvik E, Kuhlman B, Wilson PF, Almeida-Porada G, Porada CD. Microgravity Impairs DNA Damage Repair in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells and Inhibits Their Differentiation into Dendritic Cells. *Stem Cells Dev.* 2018 Sep 15;27(18):1257–67.
673. Savary CA, Graziutti ML, Przepiorka D, Tomasovic SP, McIntyre BW, Woodside DG, et al. Characteristics of human dendritic cells generated in a microgravity analog culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2001 Apr;37(4):216–22.
674. Sastry KJ, Nehete PN, Savary CA. Impairment of antigen-specific cellular immune responses under simulated microgravity conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2001 Apr;37(4):203–8.

675. Grove DS, Pishak SA, Mastro AM. The effect of a 10-day space flight on the function, phenotype, and adhesion molecule expression of splenocytes and lymph node lymphocytes. *Exp Cell Res.* 1995 Jul;219(1):102–9.
676. Chang TT, Spurlock SM, Candelario TLT, Grenon SM, Hughes-Fulford M. Spaceflight impairs antigen-specific tolerance induction in vivo and increases inflammatory cytokines. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2015 Oct;29(10):4122–32.
677. Stepkowski SM, Phan T, Zhang H, Bilinski S, Kloc M, Qi Y, et al. Immature syngeneic dendritic cells potentiate tolerance to pancreatic islet allografts depleted of donor dendritic cells in microgravity culture condition. *Transplantation.* 2006 Dec 27;82(12):1756–63.
678. Fripiat J-P. Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. *Mol Immunol.* 2013 Dec;56(4):434–41.
679. Pardon M, Gérardin P, Joubert C, Pérez-Díaz F, Cohen-Salmon C. Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal pup care behavior in mice. *Biol Psychiatry.* 2000 May 15;47(10):858–63.
680. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004 Mar;26(6):509–15.
681. Mehta SK, Laudenslager ML, Stowe RP, Crucian BE, Feiveson AH, Sams CF, et al. Latent virus reactivation in astronauts on the international space station. *NPJ Microgravity.* 2017;3:11.
682. Crucian B, Stowe R, Quiariarte H, Pierson D, Sams C. Monocyte phenotype and cytokine production profiles are dysregulated by short-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med.* 2011 Sep;82(9):857–62.
683. Kaur I, Simons ER, Kapadia AS, Ott CM, Pierson DL. Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2008 Oct;15(10):1523–8.
684. Rykova MP, Antropova EN, Larina IM, Morukov BV. Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. *Acta Astronaut.* 2008 Oct;63(7-10):697–705.
685. Brungs S, Kolanus W, Hemmersbach R. Syk phosphorylation – a gravisensitive step in macrophage signalling. *Cell Commun Signal.* 2015;13(1):9.
686. Fripiat J-P, Crucian BE, de Quervain DJ-F, 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.
687. Bascove M, Huin-Schohn C, Guéguinou N, Tschirhart E, Fripiat J-P. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2009 May;23(5):1607–15.
688. Boxio R, Dournon C, Fripiat J-P. Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2005 Mar;98(3):905–10.

689. Rettig TA, Bye BA, Nishiyama NC, Hlavacek S, Ward C, Pecaut MJ, et al. Effects of skeletal unloading on the antibody repertoire of tetanus toxoid and/or CpG treated C57BL/6J mice. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210284.
690. Vacek A, Michurina TV, Serova LV, Rotkovská D, Bartonícková A. 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)*. 1991;37(1):35–41.
691. Ichiki AT, Gibson LA, Jago TL, Strickland KM, Johnson DL, Lange RD, et al. Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J Leukoc Biol*. 1996 Jul;60(1):37–43.
692. Davis TA, Wiesmann W, Kidwell W, Cannon T, Kerns L, Serke C, et al. Effect of spaceflight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myelopoiesis. *J Leukoc Biol*. 1996 Jul;60(1):69–76.
693. Ortega MT, Pecaut MJ, Gridley DS, Stodieck LS, Ferguson V, Chapes SK. Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight. *J Appl Physiol*. 2009 Feb;106(2):548–55.
694. Sotnezova EV, Markina EA, Andreeva ER, Buravkova LB. Myeloid Precursors in the Bone Marrow of Mice after a 30-Day Space Mission on a Bion-M1 Biosatellite. *Bull Exp Biol Med*. 2017 Feb;162(4):496–500.
695. Tascher G, Gerbaix M, Maes P, Chazarin B, Ghislin S, Antropova E, et al. Analysis of femurs from mice embarked on board BION-M1 biosatellite reveals a decrease in immune cell development, including B cells, after 1 wk of recovery on Earth. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2019 Mar;33(3):3772–83.
696. Woods CC, Banks KE, Gruener R, DeLuca D. Loss of T cell precursors after spaceflight and exposure to vector-averaged gravity. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003 Aug;17(11):1526–8.
697. Woods CC, Banks KE, Lebsack TW, White TC, Anderson GA, Maccallum T, et al. Use of a microgravity organ culture dish system to demonstrate the signal dampening effects of modeled microgravity during T cell development. *Dev Comp Immunol*. 2005;29(6):565–82.
698. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010 Sep;11(9):785–97.
699. Hajishengallis G, Lambris JD. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends Immunol*. 2010 Apr;31(4):154–63.
700. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2010 Jan;20(1):34–50.
701. Jalili A, Shirvaikar N, Marquez-Curtis L, Qiu Y, Korol C, Lee H, et al. Fifth complement cascade protein (C5) cleavage fragments disrupt the SDF-1/CXCR4 axis: Further evidence that innate immunity orchestrates the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol*. 2010 Apr;38(4):321–32.
702. Flierman R, Daha MR. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology*. 2007 Jun;212(4-5):363–70.



703. Trouw LA, Blom AM, Gasque P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol Immunol*. 2008 Mar;45(5):1199–207.
704. Markiewski MM, DeAngelis RA, Lambris JD. Liver inflammation and regeneration: Two distinct biological phenomena or parallel pathophysiologic processes? *Mol Immunol*. 2006 Jan;43(1-2):45–56.
705. Mastellos DC, DeAngelis RA, Lambris JD. Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. *Semin Immunol*. 2013 Feb;25(1):29–38.
706. Markiewski MM, Nilsson B, Nilsson Ekdahl K, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol*. 2007 Apr;28(4):184–92.
707. Alexander JJ, Anderson AJ, Barnum SR, Stevens B, Tenner AJ. The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation - neuro-protection and -degeneration. *J Neurochem*. 2008 Dec;107(5):1169–87.
708. Shinjyo N, Ståhlberg A, Dragunow M, Pekny M, Pekna M. Complement-Derived Anaphylatoxin C3a Regulates In Vitro Differentiation and Migration of Neural Progenitor Cells: C3a Regulates Neural Progenitor Cell Fate and Migration. *STEM CELLS*. 2009 Nov;27(11):2824–32.
709. Nonaka M. Evolution of the complement system. *Mol Immunol*. 2004 Feb;40(12):897–902.
710. Guéguinou N, Huin-Schohn C, Ouzren-Zarhloul N, Ghislin S, Fripiat J-P. Molecular cloning and expression analysis of *Pleurodeles waltl* complement component C3 under normal physiological conditions and environmental stresses. *Dev Comp Immunol*. 2014 Oct;46(2):180–5.
711. Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, et al. Intracellular Complement Activation Sustains T Cell Homeostasis and Mediates Effector Differentiation. *Immunity*. 2013 Dec;39(6):1143–57.
712. Globus RK, Morey-Holton E. Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. *J Appl Physiol*. 2016 May 15;120(10):1196–206.
713. Schaerlinger B, Fripiat J-P. IgX antibodies in the urodele amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Dev Comp Immunol*. 2008 Jan;32(8):908–15.
714. Bascove M, Fripiat J-P. Molecular characterization of *Pleurodeles waltl* activation-induced cytidine deaminase☆. *Mol Immunol*. 2010 Apr;47(7-8):1640–9.
715. Fonte C, Gruez A, Ghislin S, Fripiat J-P. The urodele amphibian *Pleurodeles waltl* has a diverse repertoire of immunoglobulin heavy chains with polyreactive and species-specific features. *Dev Comp Immunol*. 2015 Dec;53(2):371–84.
716. Kolev M, Friec GL, Kemper C. Complement — tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol*. 2014 Dec;14(12):811–20.
717. Surace L, Lysenko V, Fontana AO, Cecconi V, Janssen H, Bicvic A, et al. Complement Is a Central Mediator of Radiotherapy-Induced Tumor-Specific Immunity and Clinical Response. *Immunity*. 2015 Apr;42(4):767–77.

718. Schmitt DA, Schwarzenberg M, Tkaczuk J, Hebrard S, Brandenberger G, Mauco G, et al. Head-down tilt bed rest and immune responses. *Pflüg Arch.* 2000 Dec;441(S1):R79–84.
719. Reis ES, Lange T, Köhl G, Herrmann A, Tschulakow AV, Naujoks J, et al. Sleep and circadian rhythm regulate circulating complement factors and immunoregulatory properties of C5a. *Brain Behav Immun.* 2011 Oct;25(7):1416–26.
720. Hollander J, Gore M, Fiebig R, Mazzeo R, Ohishi S, Ohno H, et al. Spaceflight Downregulates Antioxidant Defense Systems in Rat Liver. *Free Radic Biol Med.* 1998 Jan;24(2):385–90.
721. Rizzo A, Rossi F, Zava S, Montorfano G, Adorni L, Cotronei V, et al. Antioxidant metabolism in *Xenopus laevis* embryos is affected by stratospheric balloon flight. *Cell Biol Int.* 2007 Jul;31(7):716–23.
722. De Luca C, Deeva I, Mariani S, Maiani G, Stancato A, Korkina L. Monitoring antioxidant defenses and free radical production in space-flight, aviation and railway engine operators, for the prevention and treatment of oxidative stress, immunological impairment, and pre-mature cell aging. *Toxicol Ind Health.* 2009 May;25(4-5):259–67.
723. Tahimic C, Globus R. Redox Signaling and Its Impact on Skeletal and Vascular Responses to Spaceflight. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 16;18(10):2153.
724. Collard C., Lekowski R, Jordan J., Agah A, Stahl G. Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol.* 1999 Sep;36(13-14):941–8.
725. Collard CD, Väkevä A, Morrissey MA, Agah A, Rollins SA, Reenstra WR, et al. Complement Activation after Oxidative Stress. *Am J Pathol.* 2000 May;156(5):1549–56.
726. Hart M. Initiation of complement activation following oxidative stress. In vitro and in vivo observations. *Mol Immunol.* 2004 Jun;41(2-3):165–71.
727. Baqai FP, Gridley DS, Slater JM, Luo-Owen X, Stodieck LS, Ferguson V, et al. Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *J Appl Physiol.* 2009 Jun;106(6):1935–42.
728. Ishihara A, Fujino H, Nagatomo F, Takeda I, Ohira Y. Gene Expression Levels of Heat Shock Proteins in the Soleus and Plantaris Muscles of Rats after Hindlimb Suspension or Spaceflight. *J Physiol Sci.* 2008;58(6):413–7.
729. Stott B, Korbek M. Activation of complement C3, C5, and C9 genes in tumors treated by photodynamic therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 May;56(5):649–58.
730. Mclin VA, Hu C-H, Shah R, Jamrich M. Expression of complement components coincides with early patterning and organogenesis in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol.* 2008;52(8):1123–33.
731. Carmona-Fontaine C, Theveneau E, Tzekou A, Tada M, Woods M, Page KM, et al. Complement Fragment C3a Controls Mutual Cell Attraction during Collective Cell Migration. *Dev Cell.* 2011 Dec;21(6):1026–37.
732. Kimzey SL, Ritzmann SE, Mengel CE, Fischer CL. Skylab experiment results: hematology studies. *Acta Astronaut.* 1975 Feb;2(1-2):141–54.

733. Larina IM, Percy AJ, Yang J, Borchers CH, Nosovsky AM, Grigoriev AI, et al. Protein expression changes caused by spaceflight as measured for 18 Russian cosmonauts. *Sci Rep.* 2017 15;7(1):8142.
734. Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, Ravichandran P, Sadanandan B, Ramesh V, et al. Simulated microgravity activates apoptosis and NF- $\kappa$ B in mice testis. *Mol Cell Biochem.* 2008 Jun;313(1-2):71–8.
735. Kang C-Y, Zou L, Yuan M, Wang Y, Li T-Z, Zhang Y, et al. Impact of simulated microgravity on microvascular endothelial cell apoptosis. *Eur J Appl Physiol.* 2011 Sep;111(9):2131–8.
736. Lin S-C, Gou G-H, Hsia C-W, Ho C-W, Huang K-L, Wu Y-F, et al. Simulated Microgravity Disrupts Cytoskeleton Organization and Increases Apoptosis of Rat Neural Crest Stem Cells Via Upregulating *CXCR4* Expression and RhoA-ROCK1-p38 MAPK-p53 Signaling. *Stem Cells Dev.* 2016 Aug;25(15):1172–93.
737. Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, et al. Locally Produced Complement Fragments C5a and C3a Provide Both Costimulatory and Survival Signals to Naive CD4+ T Cells. *Immunity.* 2008 Mar;28(3):425–35.
738. Weaver DJ, Reis ES, Pandey MK, Köhl G, Harris N, Gerard C, et al. C5a receptor-deficient dendritic cells promote induction of Treg and Th17 cells. *Eur J Immunol.* 2010 Mar;40(3):710–21.
739. Crucian BE, Choukèr A, Simpson RJ, Mehta S, Marshall G, Smith SM, et al. Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions. *Front Immunol.* 2018;9:1437.
740. Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, Monk PN. Complement component 5a (C5a). *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Nov;41(11):2114–7.
741. Chung T-W, Li Y-R, Huang WY, Su J-H, Chan H-L, Lin S-H, et al. Sinulariolide suppresses LPS-induced phenotypic and functional maturation of dendritic cells. *Mol Med Rep.* 2017 Nov;16(5):6992–7000.
742. Chen S, Lu L, Wang W, Xue T, Yu J, Sun Z, et al. [Lipopolysaccharide promotes the proliferation of CD4(+) T cells by modulating the survive and cytokine secretion of dendritic cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol.* 2016 Sep;32(9):1153–7.
743. Gershovich PM, Gershovich IG, Buravkova LB. [Cytoskeleton structures and adhesion properties of human stromal precursors under conditions of simulated microgravity]. *Tsitologiia.* 2009;51(11):896–904.
744. Rösner H, Wassermann T, Möller W, Hanke W. Effects of altered gravity on the actin and microtubule cytoskeleton of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Protoplasma.* 2006 Dec;229(2-4):225–34.
745. Uva BM, Masini MA, Sturla M, Prato P, Passalacqua M, Giuliani M, et al. Clinorotation-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture. *Brain Res.* 2002 May 3;934(2):132–9.

746. Sciola L, Cogoli-Greuter M, Cogoli A, Spano A, Pippia P. Influence of microgravity on mitogen binding and cytoskeleton in Jurkat cells. *Adv Space Res Off J Comm Space Res COSPAR*. 1999;24(6):801–5.
747. Li J, Zhang S, Chen J, Du T, Wang Y, Wang Z. Modeled microgravity causes changes in the cytoskeleton and focal adhesions, and decreases in migration in malignant human MCF-7 cells. *Protoplasma*. 2009 Dec;238(1-4):23–33.
748. Yang F, Li Y, Ding B, Nie J, Wang H, Zhang X, et al. Reduced function and disassembled microtubules of cultured cardiomyocytes in spaceflight. *Sci Bull*. 2008 Apr;53(8):1185–92.
749. Meloni MA, Galleri G, Pippia P, Cogoli-Greuter M. Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modelled low gravity. *Protoplasma*. 2006 Dec;229(2-4):243–9.
750. Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Bauer J, Kossmehl-Zorn S, Cogoli A, et al. Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Tissue Res*. 2006 May;324(2):267–77.
751. Bates RC, Lincz LF, Burns GF. Involvement of integrins in cell survival. *Cancer Metastasis Rev*. 1995 Sep;14(3):191–203.
752. Bozzo C, Bellomo G, Silengo L, Tarone G, Altruda F. Soluble integrin ligands and growth factors independently rescue neuroblastoma cells from apoptosis under nonadherent conditions. *Exp Cell Res*. 1997 Dec 15;237(2):326–37.
753. Chang TT, Walther I, Li C-F, Boonyaratanakornkit J, Galleri G, Meloni MA, et al. The Rel/NF- $\kappa$ B pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity. *J Leukoc Biol*. 2012 Dec;92(6):1133–45.
754. Thiel CS, Tauber S, Christoffel S, Hüge A, Lauber BA, Polzer J, et al. Rapid coupling between gravitational forces and the transcriptome in human myelomonocytic U937 cells. *Sci Rep*. 2018 Sep 5;8(1):13267.
755. Tauber S, Christoffel S, Thiel CS, Ullrich O. Transcriptional Homeostasis of Oxidative Stress-Related Pathways in Altered Gravity. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 18;19(9).
756. Pardo SJ, Patel MJ, Sykes MC, Platt MO, Boyd NL, Sorescu GP, et al. Simulated microgravity using the Random Positioning Machine inhibits differentiation and alters gene expression profiles of 2T3 preosteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Jun;288(6):C1211–21.
757. Sambandam Y, Blanchard JJ, Daughtridge G, Kolb RJ, Shanmugarajan S, Pandravadana SNM, et al. Microarray profile of gene expression during osteoclast differentiation in modelled microgravity. *J Cell Biochem*. 2010 Dec 1;111(5):1179–87.
758. Hammond TG, Benes E, O'Reilly KC, Wolf DA, Linnehan RM, Taher A, et al. Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle. *Physiol Genomics*. 2000 Sep 8;3(3):163–73.
759. Guan S, Liu J, Fang EF, Ng TB, Lian Y, Ge H. Chronic unpredictable mild stress impairs erythrocyte immune function and changes T-lymphocyte subsets in a rat model of stress-induced depression. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014 Jan;37(1):414–22.

760. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. 2017 Apr;17(4):233–47.
761. Aiba S. Maturation of dendritic cells induced by cytokines and haptens. *Tohoku J Exp Med*. 1998 Mar;184(3):159–72.
762. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Feb;19(1):41–52.
763. Jin Y, Wi HJ, Choi M-H, Hong S-T, Bae YM. Regulation of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  in mouse dendritic cells through treatment with *Clonorchis sinensis* crude antigen. *Exp Mol Med*. 2014 Jan 31;46:e74.
764. Kurilin VV, Khantakova JN, Tereschenko VP, Lopatnikova JA, Obleukhova IA, Sennikov SV. The Effects of Immunosuppressive Factors on Primary Dendritic Cells from C57BL/6 and CBA Mice. *J Immunol Res*. 2019;2019:7029726.
765. Maestroni GJM. Dendritic Cell Migration Controlled by  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptors. *J Immunol*. 2000 Dec 15;165(12):6743–7.
766. Goyarts E, Matsui M, Mammone T, Bender AM, Wagner JA, Maes D, et al. Norepinephrine modulates human dendritic cell activation by altering cytokine release. *Exp Dermatol*. 2008 Mar;17(3):188–96.
767. Zhao J, Ma H, Wu L, Cao L, Yang Q, Dong H, et al. The influence of simulated microgravity on proliferation and apoptosis in U251 glioma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017 Sep;53(8):744–51.
768. Zhao T, Tang X, Umeshappa CS, Ma H, Gao H, Deng Y, et al. Simulated Microgravity Promotes Cell Apoptosis Through Suppressing Uev1A/TICAM/TRAF/NF- $\kappa$ B-Regulated Anti-Apoptosis and p53/PCNA- and ATM/ATR-Chk1/2-Controlled DNA-Damage Response Pathways. *J Cell Biochem*. 2016;117(9):2138–48.
769. Zhao T, Li R, Tan X, Zhang J, Fan C, Zhao Q, et al. Simulated Microgravity Reduces Focal Adhesions and Alters Cytoskeleton and Nuclear Positioning Leading to Enhanced Apoptosis via Suppressing FAK/RhoA-Mediated mTORC1/NF- $\kappa$ B and ERK1/2 Pathways. *Int J Mol Sci*. 2018 08;19(7).
770. Gasperi V, Rapino C, Battista N, Bari M, Mastrangelo N, Angeletti S, et al. A functional interplay between 5-lipoxygenase and  $\mu$ -calpain affects survival and cytokine profile of human Jurkat T lymphocyte exposed to simulated microgravity. *BioMed Res Int*. 2014;2014:782390.
771. Wang Z, Zhang F, Wang L, Yao Y, Zhao Q, Gao X. Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor(TLR)-4 and PI3K/Akt. *Cell Biol Int*. 2009 Jun;33(6):665–74.
772. Lelouard H, Schmidt EK, Camosseto V, Clavarino G, Ceppi M, Hsu H-T, et al. Regulation of translation is required for dendritic cell function and survival during activation. *J Cell Biol*. 2007 Dec 31;179(7):1427–39.

773. Svensson C, Part K, Künnis-Beres K, Kaldmäe M, Fernaeus SZ, Land T. Pro-survival effects of JNK and p38 MAPK pathways in LPS-induced activation of BV-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar 18;406(3):488–92.
774. Mitchell TC, Hildeman D, Kedl RM, Teague TK, Schaefer BC, White J, et al. Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nat Immunol*. 2001 May;2(5):397–402.
775. Abdi K, Singh NJ, Matzinger P. Lipopolysaccharide-activated dendritic cells: “exhausted” or alert and waiting? *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Jun 15;188(12):5981–9.
776. Markowicz S, Engleman EG. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest*. 1990 Mar 1;85(3):955–61.
777. Witmer-Pack MD. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*. 1987 Nov 1;166(5):1484–98.
778. Kohrgruber N, Halanek N, Gröger M, Winter D, Rappersberger K, Schmitt-Egenolf M, et al. Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Sep 15;163(6):3250–9.
779. Rougier N, Schmitt D, Vincent C. IL-4 addition during differentiation of CD34 progenitors delays maturation of dendritic cells while promoting their survival. *Eur J Cell Biol*. 1998 Mar;75(3):287–93.
780. Park Y, Lee SW, Sung YC. Cutting Edge: CpG DNA Inhibits Dendritic Cell Apoptosis by Up-Regulating Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins Through the Phosphatidylinositol-3'-OH Kinase Pathway. *J Immunol*. 2002 Jan 1;168(1):5–8.
781. Schulz AM, Stutte S, Hogg S, Luckashenak N, Dudziak D, Leroy C, et al. Cdc42-dependent actin dynamics controls maturation and secretory activity of dendritic cells. *J Cell Biol*. 2015 Nov 9;211(3):553–67.
782. Caiello I, Minnone G, Holzinger D, Vogl T, Prencipe G, Manzo A, et al. IL-6 amplifies TLR mediated cytokine and chemokine production: implications for the pathogenesis of rheumatic inflammatory diseases. *PLoS One*. 2014;9(10):e107886.
783. De Gassart A, Camosseto V, Thibodeau J, Ceppi M, Catalan N, Pierre P, et al. MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 4;105(9):3491–6.
784. Tze LE, Horikawa K, Domaschek H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med*. 2011 Jan 17;208(1):149–65.
785. Volchenkov R, Karlsen M, Jonsson R, Appel S. Type 1 regulatory T cells and regulatory B cells induced by tolerogenic dendritic cells. *Scand J Immunol*. 2013 Apr;77(4):246–54.
786. De Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Kapsenberg ML. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *J Leukoc Biol*. 1999 Aug;66(2):201–4.

787. Demeure CE, Tanaka H, Mateo V, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 Engagement Inhibits Cytokine Production and Maturation of Human Dendritic Cells. *J Immunol*. 2000 Feb 15;164(4):2193–9.
788. Harris SA, Zhang M, Kidder LS, Evans GL, Spelsberg TC, Turner RT. Effects of orbital spaceflight on human osteoblastic cell physiology and gene expression. *Bone*. 2000 Apr;26(4):325–31.
789. Moser D, Sun SJ, Li N, Biere K, Hoerl M, Matzel S, et al. Cells' Flow and Immune Cell Priming under alternating g-forces in Parabolic Flight. *Sci Rep*. 2019 Aug 2;9(1):11276.
790. Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Pockwinse SH, McNeil S. Implications for interrelationships between nuclear architecture and control of gene expression under microgravity conditions. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1999;13 Suppl:S157–66.
791. Singh KP, Kumari R, Dumond JW. Simulated microgravity-induced epigenetic changes in human lymphocytes. *J Cell Biochem*. 2010 Sep 1;111(1):123–9.
792. Chowdhury B, Seetharam A, Wang Z, Liu Y, Lossie AC, Thimmapuram J, et al. A Study of Alterations in DNA Epigenetic Modifications (5mC and 5hmC) and Gene Expression Influenced by Simulated Microgravity in Human Lymphoblastoid Cells. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147514.
793. Trotter B, Otte KA, Schoppmann K, Hemmersbach R, Fröhlich T, Arnold GJ, et al. The influence of simulated microgravity on the proteome of *Daphnia magna*. *NPJ Microgravity*. 2015;1:15016.
794. Grimm D, Pietsch J, Wehland M, Richter P, Strauch SM, Lebert M, et al. The impact of microgravity-based proteomics research. *Expert Rev Proteomics*. 2014 Aug;11(4):465–76.
795. Loktev SS, Ogneva IV. DNA Methylation of Mouse Testes, Cardiac and Lung Tissue During Long-Term Microgravity Simulation. *Sci Rep*. 2019 May 28;9(1):7974.
796. Constant S, Sant'Angelo D, Pasqualini T, Taylor T, Levin D, Flavell R, et al. Peptide and protein antigens require distinct antigen-presenting cell subsets for the priming of CD4+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1995 May 15;154(10):4915–23.
797. Bradley JH, Stein R, Randolph B, Molina E, Arnold JP, Gregg RK. T cell resistance to activation by dendritic cells requires long-term culture in simulated microgravity. *Life Sci Space Res*. 2017 Nov;15:55–61.
798. Huang G, Wang Y, Vogel P, Kanneganti T-D, Otsu K, Chi H. Signaling via the kinase p38 $\alpha$  programs dendritic cells to drive TH17 differentiation and autoimmune inflammation. *Nat Immunol*. 2012 Jan 8;13(2):152–61.
799. Rutella S, Lemoli RM. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett*. 2004 Jun;94(1-2):11–26.
800. Boks MA, Kager-Groenland JR, Haasjes MSP, Zwaginga JJ, van Ham SM, ten Brinke A. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction — A comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin Immunol*. 2012 Mar;142(3):332–42.
801. Ruden DM, Bolnick A, Awonuga A, Abdulhasan M, Perez G, Puscheck EE, et al. Effects of Gravity, Microgravity or Microgravity Simulation on Early Mammalian Development. *Stem Cells Dev*. 2018 Sep 15;27(18):1230–6.

802. Wang J, Lü D, Mao D, Long M. Mechanomics: an emerging field between biology and biomechanics. *Protein Cell*. 2014 Jul;5(7):518–31.
803. Taylor PW. Impact of space flight on bacterial virulence and antibiotic susceptibility. *Infect Drug Resist*. 2015;8:249–62.
804. Laakko T, Fraker P. Rapid changes in the lymphopoietic and granulopoietic compartments of the marrow caused by stress levels of corticosterone. *Immunology*. 2002 Jan;105(1):111–9.
805. Taves MD, Hamden JE, Soma KK. Local glucocorticoid production in lymphoid organs of mice and birds: Functions in lymphocyte development. *Horm Behav*. 2017;88:4–14.
806. Lebsack TW, Fa V, Woods CC, Gruener R, Manziello AM, Pecaut MJ, et al. Microarray analysis of spaceflown murine thymus tissue reveals changes in gene expression regulating stress and glucocorticoid receptors. *J Cell Biochem*. 2010 May 15;110(2):372–81.
807. Martinez EM, Yoshida MC, Candelario TLT, Hughes-Fulford M. Spaceflight and simulated microgravity cause a significant reduction of key gene expression in early T-cell activation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015 Mar 15;308(6):R480–8.
808. Thiel CS, Paulsen K, Bradacs G, Lust K, Tauber S, Dumrese C, et al. Rapid alterations of cell cycle control proteins in human T lymphocytes in microgravity. *Cell Commun Signal CCS*. 2012 Jan 24;10(1):1.
809. Sasaki S, Sullivan M, Narvaez CF, Holmes TH, Furman D, Zheng N-Y, et al. Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *J Clin Invest*. 2011 Aug;121(8):3109–19.
810. Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Dec;13(12):875–87.







## Résumé

Au cours des vols spatiaux, les astronautes sont sujets à de nombreux stress perturbant leur organisme et notamment leur système immunitaire. Afin d'étudier ces altérations et du fait du nombre restreint de missions spatiales, il est nécessaire d'utiliser des modèles permettant de simuler, sur Terre, les stress rencontrés en vol. Au cours de cette thèse, nous avons étudié les effets de stress associés aux vols spatiaux sur le système du complément et les cellules dendritiques (DC).

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets d'une combinaison de stress ou de stress individuels, sur l'expression de la molécule C3 du complément chez l'amphibien et la souris. Nous avons montré que certains de ces stress associés aux vols spatiaux, dont la microgravité simulée, provoquent une augmentation de C3 dans des larves de *P. waltl*. Toutefois, ces variations ne sont pas retrouvées chez des souris placées en microgravité simulée par suspension anti-orthostatique.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié *in vitro* les effets d'une microgravité simulée (RPM) sur le phénotype et la fonction de DC murines. Nous avons montré que la structure du cytosquelette d'actine et la survie des DC étaient altérées par la microgravité simulée. De plus, les DC exposées à la RPM présentent un phénotype plus immature caractérisé à la fois par une diminution de l'expression membranaire des molécules de co-stimulation mais également de leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Bien que ces caractéristiques soient indispensables aux fonctions des DC, les modifications mises en évidence ne semblent toutefois pas altérer leur capacité à présenter l'antigène.

Pris ensemble, ces résultats montrent l'importance d'étudier les effets de stress associés aux vols spatiaux, comme la microgravité, sur le système immunitaire. Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu permettra de comprendre les effets du stress sur la santé et de développer des contre-mesures adaptées aux vols spatiaux.

**Mots clés :** Stress ; Vols spatiaux ; Microgravité ; Système du complément ; Cellules dendritiques.

## Abstract

During spaceflights, astronauts encounter numerous stresses leading to immune system impairment. Given the scarcity of space missions, simulation models are used on Earth to study the effects of spaceflight-associated stresses on the immune system. The aim of this thesis was to study the effects of spaceflight-associated stresses on the complement system and on dendritic cells (DC).

First, we studied the effects of individual or combined spaceflight-associated stresses on the C3 molecule expression in amphibians and mice. We showed that some of these stresses such as microgravity increased the C3 complement expression in *P. waltl* larvae but no variation were found in mice subjected to simulated microgravity (hindlimb unloading model).

We also studied the effects of simulated microgravity by RPM on murine DC phenotype and function. We showed that RPM exposure impaired both DC actin cytoskeleton and survival. Moreover, DC exposed to simulated microgravity showed an immature phenotype characterized by a decrease of co-stimulation molecule expression and pro-inflammatory cytokines secretion, which are essentials for DC functions. However, these numerous alterations did not affect antigen presentation to T cells.

Taken together, these results highlight the significant effects of spaceflight-associated stresses on the immune system. Studying microgravity will allow to better understand its effects on health and to develop adapted countermeasures.

**Key Words :** Stress; Spaceflight; Microgravity ; Complement system ; Dendritic cells