



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

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 bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

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 **Gaetano CALCAGNO**

Effets des modifications gravitaires rencontrées lors des vols spatiaux sur les cellules dendritiques et la lymphopoïèse T

Soutenue le 08.12.2022

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mr Philippe SAAS	Professeur des Universités, INSERM U1098, Université de Franche-Comté, Besançon
	Mme Fanny MONNEAUX	Chargé de Recherche CNRS, I2CT, Université de Strasbourg, Strasbourg
Examineurs :	Mr Eric TSCHIRHART	Professeur des Universités, Department of Life Sciences and Medicine, Université du Luxembourg, Esch-sur-Alzette
	Mme Stéphanie GRANDEMANGE	Professeur des Universités, UMR 7039, Université de Lorraine, Nancy
	Mr Jean-Pol FRIPPIAT	Professeur des Universités, UR 7300, Université de Lorraine, Nancy (directeur de thèse)
	Mme Sandra KAMINSKI	Maître de conférences, UR 7300, Université de Lorraine, Nancy (co-directeur de thèse)



"Stress is the Spice of Life; the absence of stress is death"

Hans Selye

Remerciements

La thèse est une aventure, et comme toute aventure, elle ne se mène pas seul. Pendant ces trois dernières années, j'ai croisé le chemin de plusieurs personnes qui m'ont encadrées, accompagnées ou soutenues et il est temps pour moi de les remercier.

Dans un premier temps j'aimerais remercier les membres de mon jury qui ont accepté et pris le temps d'évaluer mon travail. Un grand merci à Mr Philippe Saas qui a également fait partie de mon comité de suivi, Mme Fanny Monneaux, Mr Eric Tschirhart et Mme Stéphanie Grandemange. Merci également à Mr David Moulin qui a suivi cette thèse pendant ces trois années en faisant parti de mon comité de suivi.

À mon directeur de thèse, Jean-Pol Frippiat, merci à vous de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et m'avoir donné la chance et les moyens de réaliser cette thèse. Merci également pour votre accueil lors de mes deux stages, en M1 et en M2, pendant lesquels vous m'avez aidé et soutenu pour la préparation de mes soutenances et pour l'oral de l'école doctorale. Je vous remercie également de m'avoir donné la chance de m'ouvrir à l'international en me donnant l'opportunité de participer au congrès COSPAR à Athènes. Enfin, un grand merci pour l'aide à l'écriture de ce manuscrit. Je suis conscient que ça n'a pas toujours été facile et que je vous ai donné quelques sueurs froides, mais voilà, nous y sommes arrivés.

À ma co-directrice, Sandra Kaminski, merci pour tout. Cette aventure a démarré il y a maintenant presque cinq ans lors de mon stage de M1. Cinq années à chercher les DC alors qu'on me répétait qu'elles n'existaient pas. Merci de m'avoir accompagné dans cette recherche. Ce projet, je l'ai aimé, je l'ai adoré et je l'ai (parfois) détesté. Je garderai un merveilleux souvenir de cette manip de polarisation qui m'a tant fait souffrir, mais aussi de cet optimisme qui te caractérise tant. Je me rappellerai toujours quand tu me disais « on est large », et qu'on s'est retrouvé à figoler mon mémoire de M2 au labo à 2h du

matin. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris mais aussi pour la correction de ce manuscrit.

Cette thèse ne serait pas ce qu'elle est sans notre mère à tous au laboratoire, Steph. Je tiens à te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Désolé de t'avoir posé un nombre interminable de questions et merci pour m'avoir proposé ton aide à chaque instant où j'en avais besoin. Tu m'as aidé sur de nombreux points, que ce soit au niveau technique, au niveau de l'interprétation de mes résultats ou encore en partageant tes nombreuses connaissances. Sache que je ne suis toujours pas devenu une calculatrice humaine et que j'ai toujours besoin d'une feuille et d'un stylo pour te suivre dans tes calculs, mais maintenant je sais faire un tampon. Je te remercie également pour cette belle coopération pendant laquelle tu nous as lancé le défi de réaliser un CHIP en trois mois, quitte à ne pas trop dormir ! Et surtout merci pour ta bonne humeur et tes chansons de Noël quelle que soit la période de l'année.

Quand on parle de bonne humeur au laboratoire SIMPA, on pense forcément à Julie, *alias* « Mother of Xenopes », ma belle rencontre du laboratoire. J'ai très vite compris qu'avec toi travail rimait avec bonne humeur. Quelques semaines après mon arrivée, tu as commencé à piéger mon bureau ainsi qu'à me faire des chasses au trésor et bien entendu « c'est la femme de ménage » ... la pauvre, elle doit avoir bon dos. Merci pour tous ces moments de rigolade. Grâce à toi, la thèse passe mieux. Merci aussi pour la résolution de tous mes problèmes les plus farfelus. Après tout, tu as l'habitude vu les défis techniques qu'on te demande de relever (on se rappellera de cette culture de cellules au frigo). Enfin, on se souviendra longtemps de ce congrès à Athènes où on s'est soutenus mutuellement pour ne pas faire de crise de panique. Merci aussi pour toutes nos discussions, ta bienveillance et ton soutien dans les moments où j'en avais besoin.

J'aimerais également remercier les autres doctorants du laboratoire. Jordan et Maurine, les deux microbiologistes, ainsi que Pauline qui m'a réconcilié avec V(D)J et qui forme un duo parfait avec Julie. Jordan, *alias* Raiponce, j'espère que tu pourras bientôt t'échapper de ta tour. Pauline, fais attention, les pipettes c'est dangereux ! Je vous remercie tous les trois pour votre soutien et pour les discussions à n'en plus finir sur des sujets que nous

sommes les seuls à pouvoir comprendre. Je vous souhaite à tous une belle réussite dans vos projets.

Un grand merci à Armelle et sa culture débordante, qui est toujours présente pour des discussions passionnantes et enrichissantes. Merci à toi, Florence, qui m'a soutenu psychologiquement pendant mes longues séances d'analyse sur FlowJo. Je n'oublie pas non plus Patricia, notre gardienne des coffres, je vous remercie d'avoir retourné les services de l'université dès le début de ma thèse. Enfin, j'aimerais remercier tous les autres membres du laboratoire qui ont contribué de près ou de loin à cette thèse. Je vous remercie notamment de m'avoir posé les bonnes questions et d'avoir eu de bons conseils lors des réunions de laboratoire.

J'aimerais aussi remercier Frances pour sa gentillesse et son accueil au niveau de l'animalerie de l'ENSAIA. J'en profite également pour vous remercier, toi et Thomas, pour cette belle collaboration. Je remercie également toutes les personnes travaillant à l'ACBS pour leur disponibilité et leur accueil. Un grand merci à Huguette Louis de la plateforme de cytométrie en flux pour son aide, sa gentillesse et sa disponibilité. Enfin, je souhaite remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, le Centre National d'Etudes Spatiales, l'Université de Lorraine et l'école doctorale BioSE pour avoir rendu possible cette aventure.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont rappelé qu'il y avait une vie à côté de la thèse. Merci à toutes ces personnes à qui j'ai expliqué sans cesse mon sujet de thèse et qui essayent encore aujourd'hui de comprendre ce que je fais. Je remercie mes amis que je n'ai pas le courage de citer, de peur d'en oublier, mais merci aux Kerbachois qui se reconnaîtront et qui ont été un soutien tout au long de cette thèse. Je vous remercie pour toutes ces soirées où je ne pensais plus à ma thèse. Je n'oublie pas non plus ma belle-famille, merci d'avoir essayé de lire ma publication. A mon nonno et ma nonna qui ont tant de fois essayé de comprendre pourquoi mes manips ne marchaient pas, merci d'avoir été là pour moi. J'aimerais remercier ma sœur, Claire, pour qui je suis un extraterrestre. Enfin, je remercie ceux à qui je dois cette thèse et qui m'ont donné les moyens de réaliser ces belles études,

mes parents. Merci d'avoir cru en moi. Je remercie particulièrement ma maman pour avoir régalé le laboratoire avec ses succulents gâteaux.

Je vais finir en remerciant ma supportrice numéro un. Merci à toi, Amélie, de m'avoir accompagné tout au long de cette thèse. Dans mes moments de doute, de stress, de panique, tu as toujours été une oreille attentive et je t'en remercie. Je ne sais pas comment tu as fait pour me supporter pendant ces trois années, mais tu mérites une médaille.

À vous tous qui avez pu m'aider au cours de ces trois années et à ceux que j'ai pu oublier, un grand merci.

Gaetano

Table des matières

INTRODUCTION	11
I. LE SYSTEME IMMUNITAIRE	11
1. Généralités.....	11
2. L'immunité innée	11
2.1. Les barrières physiques et chimiques.....	11
2.1. Les cellules de l'immunité innée.....	12
2.2. Reconnaissance de l'antigène.....	13
2.3. Déroulement de la réponse innée	13
2.4. Les cellules dendritiques.....	14
2.4.1. Généralités.....	14
2.4.2. Origine et différenciation.....	14
2.4.3. Sous-populations de cellules dendritiques	15
a. Les cellules dendritiques conventionnelles.....	16
b. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes	16
c. Autres	16
2.4.4. Différenciation <i>in vitro</i> des cellules dendritiques	17
2.4.5. Activation, maturation et migration	17
a. État inactif et immature des cellules dendritiques.....	17
b. Reconnaissance, capture de l'antigène et activation/maturation	18
c. Régulation de l'activation/maturation des cellules dendritiques : voies de signalisation impliquées.....	19
3. L'immunité adaptative.....	20
3.1. Généralités	20
3.2. Les cellules de l'immunité adaptative : les lymphocytes.....	21
3.2.1. Les lymphocytes B.....	21
a. Généralités	21
b. Sous-populations de lymphocytes B	21
c. Activation, augmentation de la spécificité du BCR et mémoire immunitaire	22
3.2.2. Les lymphocytes T.....	22
a. Origine et maturation des lymphocytes T.....	22
b. Le TCR, récepteur des lymphocytes T.....	23
c. Mise en place du TCR et sélection des lymphocytes T	24

d.	Création de la diversité du répertoire de TCR : la recombinaison V(D)J	26
e.	Fonctions, activation et mémoire immunitaire des lymphocytes T	29
3.3.	Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative	30
3.3.1.	Présentation antigénique et activation des lymphocytes T	30
3.3.2.	Polarisation des lymphocytes T CD4+	32
3.3.3.	Rôle des cellules dendritiques dans le maintien de la tolérance périphérique .	33
II.	ROLE DES FACTEURS EPIGENETIQUES DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE	34
1.	<i>Généralités</i>	34
1.1.	La méthylation de l'ADN.....	35
1.2.	La modification des histones	36
1.2.1.	Structure	36
1.2.2.	Code histone et fonctions	37
1.2.3.	Complexes enzymatiques	38
1.3.	Les ARN non codants	38
2.	<i>Épigénétique et cellules dendritiques</i>	39
3.	<i>Épigénétique et lymphocytes T</i>	41
3.1.	Pendant le développement	41
3.2.	Pendant l'activation.....	42
III.	LE STRESS.....	43
1.	<i>Historique</i>	43
2.	<i>Définition</i>	44
3.	<i>La réponse de l'organisme face au stress : le syndrome général d'adaptation</i>	45
3.1.	Phase d'alarme : activation du système sympathique	45
3.2.	Phase de résistance et d'épuisement : activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS).....	46
3.2.1.	Mode d'action de l'axe HHS.....	46
3.2.2.	Régulation de l'axe HHS	47
3.2.3.	Dérégulation de l'axe HHS	48
4.	<i>Impact du stress sur le système immunitaire</i>	48
4.1.	Stress aigu.....	49
4.2.	Stress chronique	51
IV.	VOLS SPATIAUX ET IMPACT SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE	53
1.	<i>Généralités</i>	53
2.	<i>Stress rencontrés lors de vols spatiaux</i>	53

2.1.	Stress socio-environnementaux et missions spatiales	53
2.2.	Stress physiques et missions spatiales	54
2.2.1.	La température	54
2.2.2.	Les rayonnements ionisants.....	54
2.2.3.	Le bruit.....	55
2.2.4.	La gravité.....	55
3.	<i>Les changements gravitaires</i>	55
3.1.	Modèles d'études des changements gravitaires	55
3.1.1.	L'hypergravité	56
3.1.2.	La microgravité	57
a.	Chez l'homme.....	57
b.	Chez le rongeur	58
c.	<i>In vitro</i>	59
3.2.	Effets des modifications gravitaires sur le système immunitaire	60
3.2.1.	Généralités.....	60
3.2.2.	Effets sur les lymphocytes T.....	62
3.2.3.	Effets sur les cellules dendritiques.....	63
3.2.4.	Voies de signalisation et modifications gravitaires	64
3.2.5.	Épigénétique et modifications gravitaires	65
OBJECTIFS		67
I.	OBJECTIF 1 : ÉTUDE DES EFFETS DU STRESS MICROGRAVITAIRE SUR LES CELLULES DENDRITIQUES MURINES.....	67
II.	OBJECTIF 2 : ÉTUDE DES EFFETS DU STRESS HYPERGRAVITAIRE SUR LA LYMPHOPOÏÈSE T.....	69
OBJECTIF 1 : ÉTUDE DES EFFETS DU STRESS MICROGRAVITAIRE SUR LES CELLULES DENDRITIQUES MURINES.....		71
I.	INTRODUCTION	71
II.	MATERIEL ET METHODES	72
1.	<i>Animaux</i>	72
2.	<i>Culture cellulaire</i>	73
2.1.	Prélèvement de moelle osseuse et différenciation des cellules dendritiques	73
2.2.	Purification des cellules dendritiques spléniques.....	73
2.3.	Purification des LT CD4+ OT-II naïfs.....	74

2.4.	Inhibition d'EZH2 et de JMJD3.....	74
3.	<i>Exposition au stress microgravitaire.....</i>	75
4.	<i>RTqPCR.....</i>	75
5.	<i>Extractions protéiques.....</i>	76
6.	<i>Western Blot.....</i>	77
7.	<i>Prolifération des LT CD4+ OT-II naïfs.....</i>	77
8.	<i>Polarisation des LT CD4+ OT-II naïfs.....</i>	78
9.	<i>Cytométrie en flux.....</i>	78
9.1.	Étude du phénotype des BMDC.....	78
9.2.	Marquage intracellulaire.....	79
9.3.	Acquisition et analyse.....	79
10.	<i>Statistiques.....</i>	79
III.	RESULTATS.....	80
1.	<i>Impact du stress microgravitaire sur le phénotype et la fonction des DC.....</i>	80
1.1.	Effets de la microgravité sur le phénotype des DC.....	80
1.2.	Effets de la microgravité sur la fonction des DC.....	81
2.	<i>Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans les altérations des DC soumises au stress microgravitaire.....</i>	83
2.1.	Effets de la microgravité sur les voies de signalisation régissant l'activation/maturation des DC.....	83
2.2.	Effets de la microgravité sur EZH2 et JMJD3/UTX.....	84
2.3.	Implication d'EZH2 et JMJD3/UTX dans la régulation de la différenciation et de du phénotype d'activation/maturation des DC.....	86
2.3.1.	Rôle dans la différenciation.....	86
2.3.2.	Rôle dans l'activation/maturation.....	87
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	88
1.	<i>Effet du stress microgravitaire sur le phénotype et la fonction des DC.....</i>	89
2.	<i>Étude des mécanismes moléculaires responsables des altérations des DC soumises à la microgravité.....</i>	91
2.1.	Étude des voies de signalisation impliquées dans l'activation/maturation.....	91
2.2.	Étude de EZH2 et JMJD3/UTX.....	92
2.2.1.	Effet de la microgravité sur l'expression et la fonction d'EZH2 et JMJD3/UTX..	92

2.2.2. Implication d'EZH2 et de JMJD3 dans la différenciation et l'activation/maturation des DC	95
V. CONCLUSION	96
OBJECTIF 2 : ÉTUDE DES EFFETS DU STRESS HYPERGRAVITAIRE SUR LA LYMPHOPOÏÈSE T.	98
I. INTRODUCTION	98
II. RESULTATS	99
1. <i>Impacts du stress hypergravitaire sur la lymphopoïèse T</i>	99
2. <i>Effets du stress hypergravitaire sur le répertoire TCRβ</i>	100
3. <i>Effets du stress hypergravitaire sur H3K27me3 et l'expression d'EZH2</i>	101
4. <i>Impacts de l'hypergravité sur le niveau de triméthylation d'H3K27 au niveau des segments Vβ</i>	102
5. <i>Implication d'EZH2 dans la modification post-traductionnelle d'H3K27me3 au niveau des segments Vβ</i>	103
III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	103
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	108
ANNEXE 1	112
ANNEXE 2	113
ANNEXE 3	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	115

Liste des abréviations

%	Pourcentage
°/sec	Degré par seconde
°C	Degré celcius
11β-HSD1/2	11 β-HydroxyStéroïde Déshydrogénases 1/2
2D/3D	2 Dimensions / 3 Dimensions
ACBS	Animalerie du Campus Biologie-Santé
ACTH	Adreno CorticoTrophic Hormone
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ANOVA	ANalysis Of VAriance
AP-1	Activator Protein 1
APC	AlloPhycoCyanine
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ASE	Anti Silencing Element
ATP	Adénosine TriPhosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BCR	B Cell Receptor
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1
BMDC	Bone Marrow derived Dendritic Cell
bp	base pairs
BSA	Bovine Serum Albumin
c-SMAC	central-SMAC
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein alpha
CCL	C-C Motif Chemokine Ligand
CCR	C-C Chemokine Receptor
CD	Cluster de Différenciation
cDC	Cellule Dendritique conventionnelle
Cdkn2a	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CDP	Common DC Precursor
CDR	Complementarity Determining Region
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CLR	C-type Lectin Receptors
CMHI	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CMHII	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CO₂	Dioxyde de Carbone
ConA	Concanavaline A
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CREB	Cyclic adenosine monophosphate Response Element-Binding protein
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CTACK	Cutaneous T-Cell Attracting Chemokine
CTLA-4	Cytotoxique T Lymphocyte Antigen 4 protein

CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
d-SMAC	distal SMAC
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
dB	décibel
DC	Cellule Dendritique
DCAC	Défaillance Cardiovasculaire Aigu et Chronique
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DN	Double Négatif
DNA-PK	DeoxyriboNucleic Acid-dependent Protein Kinase
DNMT	DNA MethylTransferase
dNTP	deoxyriboNucleotide TriPhosphate
DP	Double Positif
DTT	DiThioThréitol
e.g.	exempli gratia
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
EDTA	ÉthylèneDiamineTétraAcétique
EED	Embryonic Ectoderm Development
Ef1a	Elongation factor 1 alpha
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
Eif3f	Eukaryotic translation initiation factor 3 Subunit f
ENSAIA	École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
ERK1/2	Extracellular signal Regulated Kinases ½
ESA	European Space Agency
EZH1/2	Enhancer of Zeste Homolog 1/2
FcR Block	Fc Receptor Blocking Reagent
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
Flt-3L	Fms-like tyrosine kinase 3 Ligand
Flt-3R	Fms-like tyrosine kinase 3 Receptor
g	gramme
GAPDH	GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
GC	GlucoCorticoïdes
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GR	Glucocorticoid Receptor
GRE	Glucocorticoid Response Element
GusB	Glucuronidase Beta
h	heure
H2AK119Ub1	ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A
H3K27ac	acétylation de la lysine 27 de l'histone H3
H3K27me3	triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3
H3K4me1/2/3	(di/tri)méthylation de la lysine 4 de l'histone H3
H3K9ac	acétylation de la lysine 9 de l'histone H3
H3K9me3	triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3
H3K9pan-methyl	mono/di/triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3
HDAC	Histone DésACétylase
HHS	Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien
HSP70L1	Heat Shock Protein 70-Like protein 1
HU	Hindlimb Unloading

IBSLor	Ingénierie, Biologie, Santé en Lorraine
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	InterFéron
Ig	Immunoglobuline
IL	InterLeukine
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IP-10	Interferon gamma-induced Protein 10
IRF-3	Interferon Regulatory Factor 3
ISP8	Immature Single Positive CD8+
ISS	International Space Station
j	jour
JARID1c	Jumonji, AT Rich Interactive Domain 1c
JMJD3	Jumonji domain-containing protein D3
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
km/h	kilomètre par heure
KO	Knock Out
LB	Lymphocyte B
LB FO	LB FOliculaire
LB ZM	LB de la Zone Marginale
LFA1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
lncRNA	long non-coding RiboNucleic Acid
LPS	LipoPolySaccharide
LT	Lymphocyte T
LTc ou Tc	LT cytotoxique
LTh ou Th	LT helper
LTreg ou Treg	LT régulateur
M	Molaire
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MDB	Methyl-CpG-Binding Domain
MDP	Monocyte/DC Precursor
min	Minute
MIP-3α	Macrophage Inflammatory Protein 3α
mL	miliLitre
moDC	monocyte derived Dendritic Cell
mPDCA-1	mouse Plasmacytoid Dendritic Cell Antigen-1
MR	Mineralocorticoid Receptor
MyD88	Myeloid Differentiation primary response 88
Myf6	Myogenic factor 6
MyoD	Myoblast Determination protein 1
Myog	Myogenic Factor
n°	numéro
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFκB	Nuclear Factor-kappa B

ng	nanogramme
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NK	Natural Killer
NLR	Nucleotide-binding Leucine-rich repeat-containing Receptors
nM	nanoMolaire
Oct3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4
OTII	Ovalbumin-specific TCR Transgenic line II
ova	ovalbumine
p-SMAC	peripheral-SMAC
p/v	poids/volume
PAF	Paraformaldehyde
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PARP1	Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PC	Partie Constante
PCGF6	PolyComb Group Factor 6
pDC	Cellule Dendritique plasmacytoïde
PDL1A	Programmed Death-Ligand 1A
PE	PhycoErythrin
pH	potential Hydrogène
PKC	Protein Kinase C
PLZF	PromyeLocytic Zinc Finger
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PRR	Pattern Recognition Receptors
PV	Partie Variable
PVDF	PolyVinyliDeneFluoride
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RAG1/2	Recombination Activating Gene 1/2
RbAp46/48	Retinoblastoma protein Associated protein 46/48
RLR	RIG-1- Like Receptors
RNase	RiboNucléase
RNAseq	RiboNucleic Acid sequencing
RPM	Random Positioning Machine
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSS	Recombination Signal Sequences
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT	Reverse Transcription
s	seconde
SEM	Standard Error of the Mean
SMAC	Supra Molecular Adhesion Complex
SNC	Système Nerveux Central
sncRNA	smal non-coding RiboNucleic Acid
Sox2	SRY-Box Transcription Factor 2
SP4/8	Simple Positive CD4+/CD8+
STAT3/6	Signal Transducer and Activator of Transcription 3/6
Suz12	Suppressor of zeste- 12

Sv	Sievert
SVF	Sérum de Veau Fœtal
t	tendance
TCF-1	T Cell Factor 1
Tcm	central m emory T cells
TCR	T Cell Receptor
TdT	Terminal d eoxynucleotidyl T ransferase
TEC	Thymic E pithelial C ell
Tem	effector m emory T cells
TGFβ	T ransforming G rowth F actor β
TIR	T oll- I nterleukin-1 R eceptor
TLR	T oll L ike R eceptor
TNFα	T umor N ecrosis F actor α
TRIF	T IR domain-containing adaptator protein inducing I FNβ
Trm	tissue-resident m emory T cells
Tscm	stem m emory T cells
U	U nité
UE	U nion E uropéenne
UL	U niversité de L orraine
UMS	U nité M ixte de S ervice
UV	U ltra V iolet
V	V olt
v/v	v olume/ v olume
xg	accélération de la pesanteur
XRCC4	X - R ay R epair C ross C omplementing 4
μg	microgramme
μG	microgravité
μL	microLitre
μM	microMolaire
μm	micromètre
γH2A.X	phosphorylation de la serine 139 de l'histone H2A

Introduction

I. Le système immunitaire

1. Généralités

Le système immunitaire comprend un ensemble de molécules, de cellules, de tissus et d'organes permettant l'élaboration d'une réponse immunitaire. Il est capable de reconnaître « le non-soi » comme les bactéries, virus, champignons, parasites ou toxines pénétrant dans l'organisme et provoquant son activation. Il est également capable d'être activé par le « soi modifié » comme les cellules cancéreuses ou les brûlures. Au cours de l'évolution deux types de réactions immunitaires sont apparues. La réponse non spécifique, ou innée, est la plus ancienne et la plus conservée. La réponse spécifique, ou adaptative, est apparue plus tard (à partir des vertébrés à mâchoire).

La réponse innée constitue la première barrière de défense de l'organisme, elle est rapide et met en jeu des barrières physiques telles que la peau et les muqueuses ainsi que diverses cellules comme les granulocytes, les cellules Natural Killer (NK), les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (DC). La réponse innée n'est cependant pas adaptée de manière spécifique au pathogène auquel est confronté l'organisme et peut, dans certains cas, ne pas suffire à son élimination. Dans ce cas, se met en place la réponse adaptative qui, elle, est spécifique d'un pathogène donné. La réponse adaptative est caractérisée par l'intervention des lymphocytes T (LT) et B (LB). L'activation et la prolifération des LB aboutira à la production de plasmocytes, sécréteurs d'anticorps capables de neutraliser l'antigène. Les LT quant à eux, sécrètent des cytokines régulant la réponse immunitaire et seront capables de détruire les cellules infectées ou tumorales (LT CD8+ cytotoxiques) ou d'interagir avec d'autres types cellulaires (LT CD4+ helper). L'activation de ces cellules se fait essentiellement grâce aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles (e.g. macrophage, LB), dont les cellules dendritiques (DC) font partie.

2. L'immunité innée

2.1. *Les barrières physiques et chimiques*

Les premières barrières de défense de l'organisme sont la peau et les muqueuses. Ces barrières physico-chimiques permettent d'empêcher l'entrée des pathogènes dans l'organisme. La peau est constituée d'un épiderme kératinisé très difficile à traverser par les

pathogènes. La capacité de l'épiderme à se renouveler constamment grâce au processus de desquamation constitue un moyen efficace de l'organisme pour éliminer les éventuels pathogènes présents à sa surface. De plus, l'épiderme est un environnement relativement sec et éloigné des vaisseaux sanguins, défavorisant la survie des pathogènes. La peau possède également des organes accessoires comme les poils, qui bloquent l'entrée des pathogènes. En effet, les poils du nez permettent par exemple de limiter l'entrée des pathogènes dans le tractus respiratoire. Parmi ces organes accessoires, on compte également les glandes sébacées qui sécrètent des substances acides abaissant ainsi le pH de la surface de la peau. Ce pH acide constitue une barrière chimique efficace contre les pathogènes. Les muqueuses de l'organisme telles que les muqueuses respiratoires, gastro-intestinales et uro-génitales sécrètent du mucus qui constitue leur principal mode de défense. Cette substance visqueuse, contenant des agents antimicrobiens, permet de piéger les pathogènes et ainsi d'empêcher leur entrée. La plupart des muqueuses sont constituées de cellules ciliées permettant de repousser ce mucus vers l'extérieur de l'organisme et donc d'éliminer les éventuels pathogènes qui y sont piégés. De plus, la peau et les muqueuses sont colonisées par des cellules du système immunitaire qui jouent le rôle de cellules sentinelles. Ces cellules permettent de déclencher une réponse immunitaire dès lors qu'un pathogène traverse ces barrières.

2.1. Les cellules de l'immunité innée

L'immunité innée comprend trois types de cellules : les phagocytes, les cellules tueuses et les cellules présentatrices d'antigènes. Ces cellules sont réparties dans tout l'organisme et sont soit circulantes (e.g. circulation sanguine), soit résidentes dans les organes constituant les principales portes d'entrées de l'organisme (e.g. peau, muqueuses).

Les phagocytes sont les monocytes/macrophages, les neutrophiles et, de manière moindre, les DC. Le macrophage est la forme tissulaire du monocyte qui lui est circulant. En fonction du tissu dans lequel il se trouve, le macrophage porte un nom différent. Ainsi, les cellules de Kupffer dans le foie, les ostéoclastes dans le tissu osseux ou encore les cellules de la microglie dans le système nerveux sont des macrophages. Les monocytes/macrophages et certaines DC ont pour mode d'action de phagocyter les pathogènes après les avoir reconnus et de les détruire grâce aux lysosomes qu'ils contiennent (Hirayama et al., 2017; Savina and Amigorena, 2007). Les neutrophiles sont des granulocytes ayant le même mode d'action que les

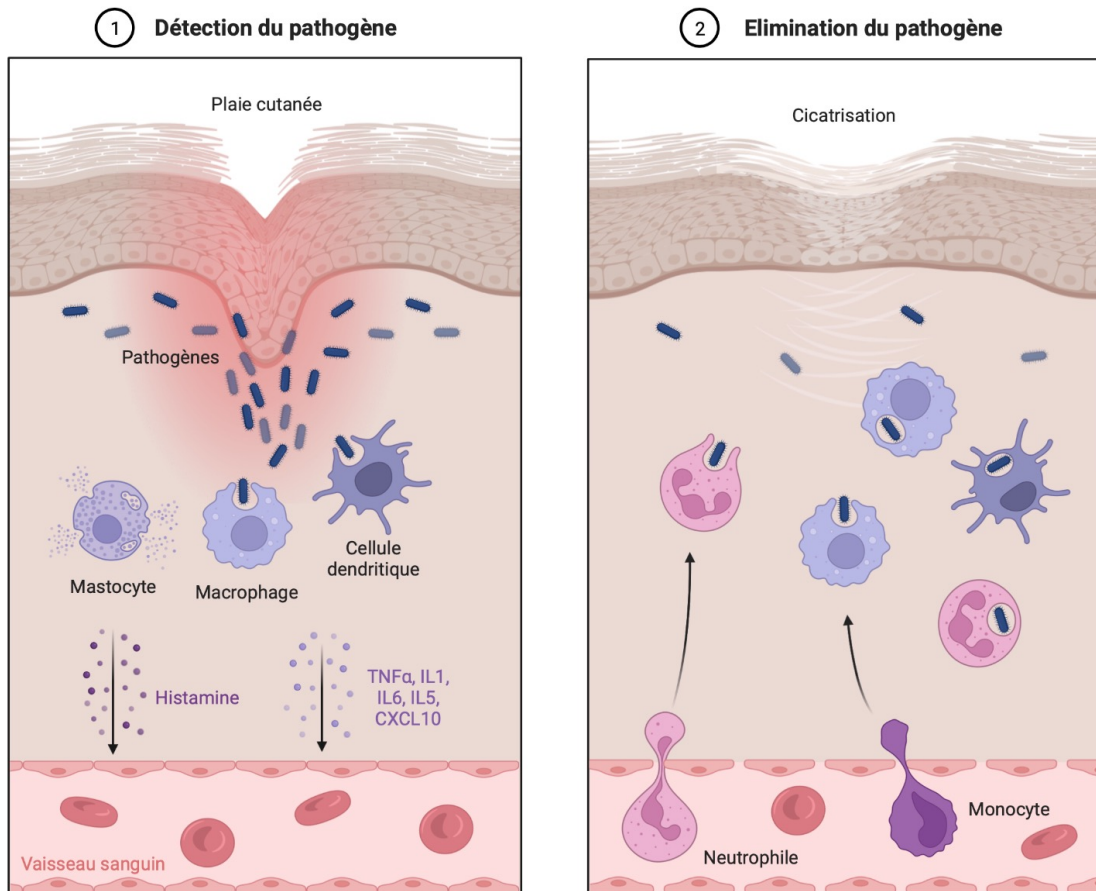


Figure 1 : Mise en place de la réponse immunitaire innée suite à une plaie cutanée. La détection du pathogène par les cellules sentinelles (mastocytes, macrophage, DC) entraîne l'activation de ces dernières. Les DC et les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines afin d'attirer les neutrophiles et les monocytes sur le site de l'inflammation. Les mastocytes libèrent de l'histamine, un agent vasodilatateur qui facilite l'arrivée de ces cellules. Les monocytes et les neutrophiles ainsi arrivés sur le site de l'inflammation participent à l'élimination du pathogène. Si le pathogène est éliminé, la réaction immunitaire s'arrête, sinon une réponse adaptative se met en place. Ce processus est principalement lié à l'activation des DC.

monocytes/macrophages, mais ils détruisent le pathogène par l'action de vésicules contenant des agents microbicides (Lee et al., 2003).

Les cellules tueuses sont les cellules Natural Killer (NK) et les éosinophiles. Les NK sont des cellules capables de reconnaître et de tuer des cellules infectées ou des cellules cancéreuses (Paul and Lal, 2017). Les éosinophiles sont quant à eux un autre type de granulocyte qui ont une action antiparasitaire (Blanchard and Rothenberg, 2009). Le mode d'action de ces cellules est de reconnaître et de libérer des agents cytotoxiques (e.g. perforine, granzyme) entraînant la lyse de la cellule qu'ils ont reconnu comme étant dangereuse.

Enfin, les CPA sont des cellules capables de reconnaître un pathogène et de présenter un antigène aux autres cellules du système immunitaire. Ce mécanisme permet notamment l'activation des cellules de l'immunité adaptative. Les principales CPA sont les DC, les monocytes/macrophages et les LB (Hirayama et al., 2017).

2.2. Reconnaissance de l'antigène

L'activation des cellules de l'immunité innée est possible grâce à leur capacité à reconnaître les substances dangereuses pour l'organisme. En effet, elles possèdent des récepteurs membranaires de la famille des PRR (Pattern Recognition Receptors). Ils sont capables de reconnaître des motifs moléculaires présents à la surface des pathogènes appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern). Les PRR peuvent aussi reconnaître des motifs associés aux dégâts appelés DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) qui correspondent à des signaux endogènes associés à un stress cellulaire. Les PRR sont subdivisées en quatre familles en fonction de leur structure : Les TLR (Toll-like receptors), les NLR (nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing receptors), les RLR (RIG-1-like receptors) et les CLR (C-type lectin receptors) (Gulati et al., 2018; Jeannin et al., 2008).

2.3. Déroulement de la réponse innée

Si les barrières physico-chimiques sont franchies, l'entrée des pathogènes dans l'organisme induit la mise en place d'une réponse immunitaire (**Figure 1**). La réponse immunitaire innée se met en place rapidement et de manière non spécifique au type de pathogène. Elle est déclenchée par la reconnaissance du pathogène par des cellules sentinelles comme les macrophages, les mastocytes, les NK et les DC (Elliott et al., 2014). Ces cellules, une fois activées, vont recruter d'autres cellules du système immunitaire sur le site de l'inflammation

telles que les neutrophiles ou les monocytes. Pour cela, les mastocytes activés vont libérer le contenu de leurs granules contenant des agents inflammatoires et notamment de l'histamine, un agent vasodilatateur. Cette vasodilatation locale va faciliter l'arrivée des autres cellules sur le site de l'inflammation. Les cellules immunitaires vont également sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le $TNF\alpha$ (Tumor Necrosis Factor α), l'IL-1 (interleukine 1) et l'IL-6 ainsi que des cytokines chimioattractantes comme l'IL-5 et CXCL10 (C-X-C motif Ligand 10) afin d'activer et d'attirer les autres cellules immunitaires sur le site de l'inflammation (Arango Duque and Descoteaux, 2014). Les cellules de l'immunité innée ainsi présente sur le lieu de l'inflammation vont alors tenter de neutraliser l'agent pathogène soit par phagocytose, soit par cytotoxicité. Si l'immunité innée est suffisante pour neutraliser le pathogène, la réaction immunitaire s'arrête, sinon, l'immunité adaptative se met en place. Pour cela, les CPA activent le système immunitaire adaptatif et font le lien entre système innée et adaptatif. Cette fonction est principalement assurée par les DC (Merad et al., 2013).

2.4. Les cellules dendritiques

2.4.1. Généralités

Les DC jouent un rôle central au sein de la réponse immunitaire car, bien qu'appartenant à l'immunité innée, elles jouent un rôle prépondérant lors de la réponse adaptative. En effet, d'une part, leur capacité de phagocytose leur permet de participer à la destruction du pathogène pendant la réponse innée. D'autre part, elles sont essentielles à l'orchestration de la réponse immunitaire à travers la présentation des antigènes et la sécrétion des cytokines aux LT CD4+. Les DC sont nombreuses au niveau des zones de contact avec le milieu extérieur, comme les muqueuses et la peau, où elles jouent le rôle de cellules sentinelles mais aussi au niveau des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate) où elles activent les LT CD4+ (Schraml and Reis e Sousa, 2015).

2.4.2. Origine et différenciation

Les cellules dendritiques sont une famille de cellules hétérogènes dans laquelle se distinguent principalement deux populations : les cDC (DC conventionnelles) et les pDC (DC plasmacytoïdes).

Hormis les cellules de Langerhans (DC présentes dans l'épiderme) qui proviennent d'un précurseur embryonnaire (Hoeffel et al., 2012), les cDC proviennent d'un progéniteur

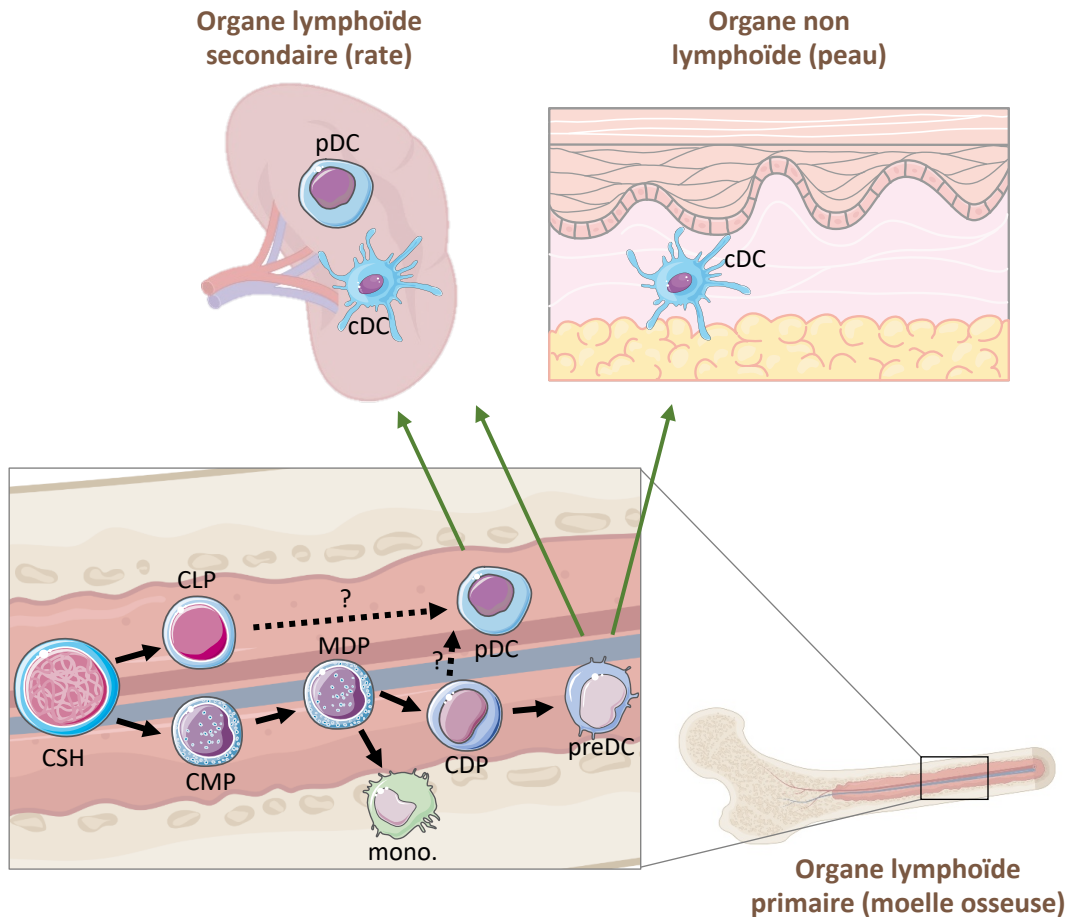


Figure 2 : Origine et différenciation des DC. Les DC proviennent de la différenciation d'un progéniteur multipotent présent dans la moelle osseuse. Une fois différenciées, les pDC migrent dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) *via* la circulation sanguine. Les cDC quant à elles migrent avant la fin de leur différenciation (à l'état de preDC) vers les organes lymphoïdes secondaires et les tissus non lymphoïdes (peau) où elles finiront leur différenciation et acquerront des marqueurs spécifiques du tissu définissant ainsi des sous-populations de cDC. Cette différenciation se fait au moyen du GM-CSF et du Flt-3L produits par les cellules stromales et les cellules immunitaires. CSH : Cellule Souche Hematopoïétique. CLP : Précurseur Lymphoïde Commun. CMP : Précurseur Myéloïde Commun. MDP : Monocyte/DC Précurseur. Mono : Monocyte. CDP : Précurseur Commun des cellules Dendritiques. pDC : Cellule Dendritique plasmacytoïde. cDC : Cellule Dendritique conventionnelle.

multipotent présent dans la moelle osseuse nommé cellule souche hématopoïétique (CSH) et capable de donner naissance aux progéniteurs de la lignée lymphoïde et myéloïde (Geissmann et al., 2010). Le précurseur commun myéloïde mature en précurseur des monocytes/macrophages et des DC nommé MDP (monocyte/DC precursor) qui se différenciera à son tour soit en précurseur des monocytes, soit en précurseur commun des DC (CDP, common DC precursor). Ce CDP a perdu sa capacité de différenciation en monocyte et se différencie en pré-DC (Liu et al., 2009). Ces cellules migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires ou non lymphoïdes (peau, muqueuses) où elles finiront leur différenciation (Sathe and Shortman, 2008) (**Figure 2**).

Les pDC, quant à elles, ont une origine encore controversée. Des travaux ont montré que leur origine pourrait être à la fois myéloïde et lymphoïde (Corcoran et al., 2003; Liu et al., 2009; Musumeci et al., 2019). Contrairement au cDC, chez la souris, les pDC sortent matures de la moelle osseuse et vont migrer vers la rate.

La différenciation des DC est contrôlée par des cytokines d'origine hématopoïétique dont les deux principales sont le ligand de Flt-3 (Flt-3L, Fms-like tyrosine kinase 3 Ligand) et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) (Haniffa et al., 2013). Le Flt-3L va agir *via* son récepteur (Flt-3R) exprimé notamment par les CDP et les pré-DC. Il est sécrété par les cellules stromales et endothéliales de nombreux tissus (e.g. moelle osseuse, rate) et par les LT activés (Lyman and Jacobsen, 1998, 1998; Miloud et al., 2012). Il participe à la différenciation finale des DC *via* la stimulation du Flt-3R et l'activation de la voie STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3) (Laouar et al., 2003). Il a été montré que le Flt-3L est suffisant pour permettre une différenciation des progéniteurs en DC (Brasel et al., 2000). Le GM-CSF joue surtout un rôle dans les étapes finales de différenciation de certaines sous-populations de DC et permet l'acquisition de leur capacité de présentation antigénique (Zhan et al., 2011).

2.4.3. Sous-populations de cellules dendritiques

La classification des différentes populations et sous-populations de DC se base sur l'expression de marqueurs de surface spécifiques, leur origine et leur spécificité fonctionnelle. De manière générale, les DC expriment en surface le cluster de différenciation (CD)11c même si les pDC l'expriment plus faiblement que les cDC. Il existe 2 sous-populations principales de cDC : les cDC exprimant CD8 α ou CD103 et les cDC exprimant CD11b (Mildner and Jung, 2014).

a. Les cellules dendritiques conventionnelles

Les cDC CD8 α + sont présentes dans les organes lymphoïdes secondaires et leurs équivalents dans les autres tissus expriment CD103. Cette population de DC est la plus connue et est surtout spécialisée dans la présentation croisée (ou cross-présentation) (Voir I.3.3.1.) (del Rio et al., 2007).

Les cDC CD11b+ sont la population de cDC majoritaires présents dans les organes lymphoïdes secondaires ou non. Cette population hétérogène de cellules est moins bien caractérisée. Il a été montré que ces cellules ont une plus faible capacité de cross-présentation que les cDC CD8 α + ou CD103+ et ont une capacité supérieure à activer les LT CD4+ (Dudziak et al., 2007). Ces cDC produisent des cytokines telles que l'IL-6 ou l'IL-23 (Persson et al., 2013; Schlitzer et al., 2013) et des chimiokines comme CCL3, CCL4 ou CCL5 (Proietto et al., 2004).

b. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC peuvent être distinguées des cDC par l'expression de mPDCA-1 (mouse Plasmacytoid Dendritic Cell Antigen-1) et de B220 (Haniffa et al., 2013). Cependant, cette expression n'est plus spécifique lorsque les cellules sont activées puisque les cDC activées peuvent aussi exprimer mPDCA-1 et B220. De plus, les pDC expriment le CD11c de manière moins importante que les cDC. Cette population de DC est retrouvée dans la circulation sanguine et les organes périphériques. Les pDC ont des caractéristiques communes aux cDC mais sont surtout connues pour leur production rapide d'IFN de type I en réponse à la reconnaissance d'un antigène viral (Nakano et al., 2001). Il est à noter que les pDC et cDC présentes dans la rate et les ganglions se développent grâce au Flt-3L.

c. Autres

Il existe d'autres populations de DC caractéristiques du type de tissus dans lequel elles se trouvent. Ces cellules sont adaptées à leur microenvironnement et présentent des marqueurs spécifiques. Par exemple, la peau qui est une des principales voies d'entrée des pathogènes possède des DC qui jouent le rôle de cellules sentinelles et qui sont différentes en fonction de la couche dans laquelle elles se trouvent. Ces cellules sont nommées cellules de Langerhans dans l'épiderme et DC dermales dans le derme (Romani et al., 1989). Enfin, il existe des DC produites à la suite d'une inflammation. Ce sont les DC différenciées à partir de monocytes (Segura and Amigorena, 2013). Cette différenciation des monocytes est possible suite à la

sécrétion de GM-CSF et d'IL-4 sur le site de l'inflammation (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Les DC dérivés de monocytes ont un phénotype et une fonction comparable aux cDC.

2.4.4. Différenciation *in vitro* des cellules dendritiques

Le faible nombre de DC disponibles chez l'animal rend leur étude difficile. Pour pallier cela, de nombreux travaux utilisent des DC différenciées *in vitro* à partir de moelle osseuse nommées BMDC (Bone Marrow derived Dendritic Cell). Il existe deux principaux modes de différenciation utilisés dans ces études. Les cellules de moelle osseuse sont cultivées pendant 7 à 10 jours dans du milieu supplémenté soit avec un mélange de GM-CSF et d'IL-4 (Haniffa et al., 2013), soit en Flt-3L (Brawand et al., 2002). La différenciation utilisant le GM-CSF et l'IL4 permet d'obtenir majoritairement des cDC. En utilisant du Flt-3L, les cellules de moelle osseuse se différencient en un mélange de cDC et de pDC avec environ 70 à 80% de cDC et 20 à 30% de pDC. Ce dernier mode de différenciation a rendu plus facile les études sur les pDC. De plus, il a été montré dans la littérature que la différenciation au Flt-3L permet d'obtenir des DC qui ont un phénotype non activé contrairement au GM-CSF et l'IL-4 qui entraînent la production de DC ayant un phénotype inflammatoire (Brawand et al., 2002; Naik et al., 2006). Le modèle de différenciation au Flt-3L a donc pour avantage de permettre une étude à la fois sur les cDC et les pDC. De plus, il est possible grâce à ce modèle d'étudier des cellules dans leur état non inflammatoire qui se rapproche le plus des conditions physiologiques (Guo et al., 2016). Il est également possible d'activer ces cellules et de les rendre inflammatoires en les mettant en présence de lipopolysaccharide (LPS) bactérien.

2.4.5. Activation, maturation et migration

a. État inactif et immature des cellules dendritiques

Les DC présentes dans les organes lymphoïdes secondaires ou non lymphoïdes ont un phénotype non activé et non mature (Merad et al., 2013; Wilson et al., 2003). A l'état inactif, les DC de souris présentent un fort niveau d'expression de différents PRR leur permettant de capter les antigènes (Pulendran et al., 2001). Les DC expriment des TLR qui peuvent être soit membranaires, soit intracellulaires. Il existe une multitude de TLR capables de reconnaître différents types d'antigènes (Hemmi and Akira, 2005). Il en découlera une signalisation différente participant à l'adaptation de la réponse immunitaire.

Ainsi, chez la souris, les cDC expriment fortement les TLR-1, 2, 4, 5 et 6. Ce sont des TLR transmembranaires capables de reconnaître des éléments de surface des bactéries (paroi,

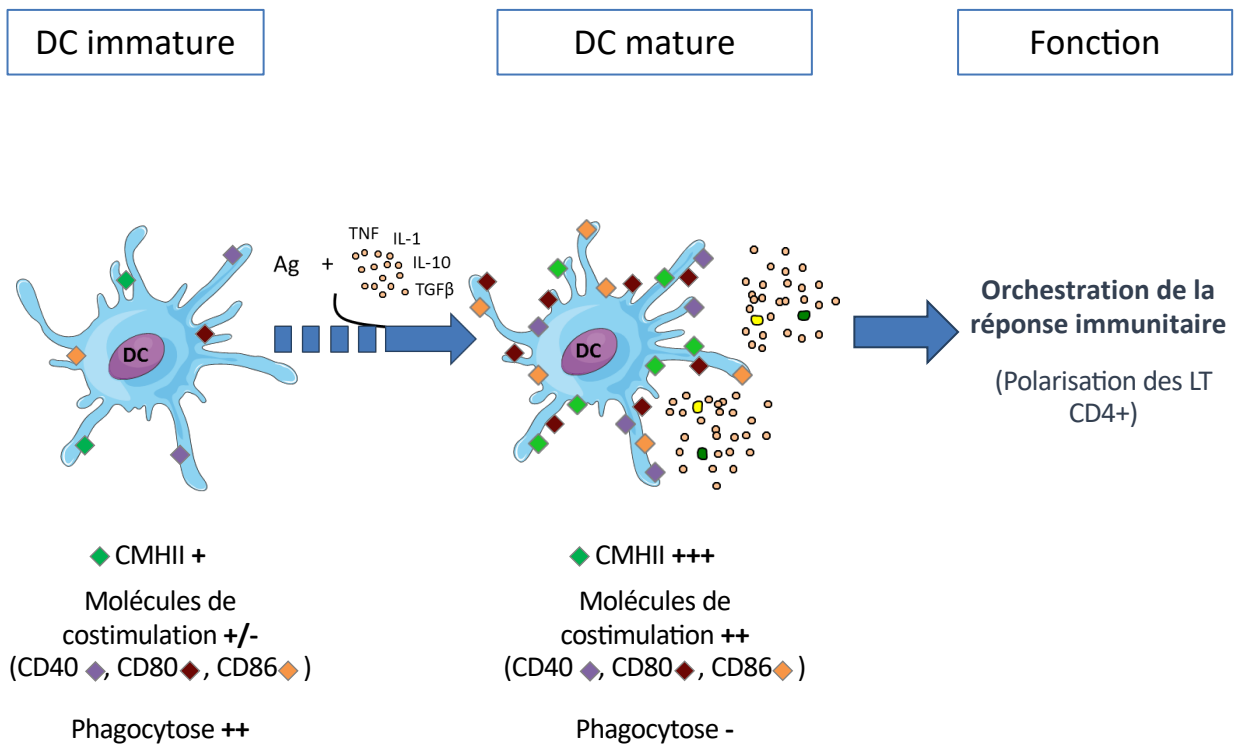


Figure 3 : Processus d'activation/maturation des DC. Les DC s'activent et mûrissent suite à la reconnaissance d'un antigène (e.g lipopolysaccharide (LPS), ADN ou ARN bactérien/viral) et la présence d'un environnement cytokinique favorable. Cette activation engendre une augmentation de l'expression du CMH II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II) et des molécules de costimulation comme CD40, CD80 et CD86. Cette activation est corrélée à la perte de leur capacité de phagocytose. Tous ces changements sont essentiels à leur fonction de polarisation et d'activation des LT CD4+.

flagelle). De cette manière, le LPS présent à la surface des bactéries gram négatives est reconnu spécifiquement par le TLR-4. Les pDC expriment des TLR intracellulaires capables de reconnaître spécifiquement les ADN et ARN viraux ce qui leur confère une fonction antivirale. Ce sont les TLR-7 et 9 qui sont exprimés dans les endosomes et qui reconnaissent respectivement l'ARN viral simple brin et l'ADN viral. Les DC immatures ont également pour caractéristique de présenter un faible niveau d'expression membranaire de diverses molécules de costimulation telles que CD80, CD86 et CD40 (Banchereau et al., 2000). Ces molécules sont indispensables à leurs fonctions notamment pour l'interaction et l'activation des LT CD4+. Les DC inactives présentent aussi une faible expression membranaire du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II) grâce auquel elles présenteront les antigènes aux LT CD4+. De plus, elles possèdent de faibles capacités migratoires qui sont corrélées avec un cytosquelette d'actine très organisé et des points focaux d'adhérence. Enfin, elles ont une grande capacité de capture (phagocytose) et d'apprêtement de l'antigène (Winzler et al., 1997) (**Figure 3**).

b. Reconnaissance, capture de l'antigène et activation/maturation

La maturation et l'activation des DC sont des mécanismes très difficilement dissociables et nous parlerons donc d'activation/maturation. Ce processus démarre par la reconnaissance d'un antigène par les PRR présents à la surface des DC. Elles vont internaliser l'antigène par phagocytose, macropinocytose ou endocytose (Steinman et al., 1999). On parle alors de phagosome. Cet antigène est découpé en peptides antigéniques par abaissement du pH à l'intérieur du phagosome. Les peptides antigéniques vont alors être couplés aux molécules de CMHII et ce complexe CMHII/peptide antigénique sera exprimé à la membrane des DC. Ce processus est appelé l'apprêtement de l'antigène (Trombetta and Mellman, 2005) (**Figure 4**).

Le complexe CMHII/peptide antigénique va permettre aux DC de présenter l'antigène aux LT CD4+. De plus, pour induire l'activation des LT CD4+, les DC, au cours de leur activation/maturation, vont augmenter l'expression membranaire de leurs molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 (Banchereau et al., 2000). L'expression du complexe peptide/CMHII et des molécules de costimulation constitue le phénotype mature des DC (**Figure 3**). Il a été montré qu'au cours de ce processus, les molécules de CMHII ne sont pas produites *de novo* (Pierre et al., 1997). En effet, les DC immatures possèdent des stocks de molécules de CMHII non associées à un peptide antigénique au sein de vésicules

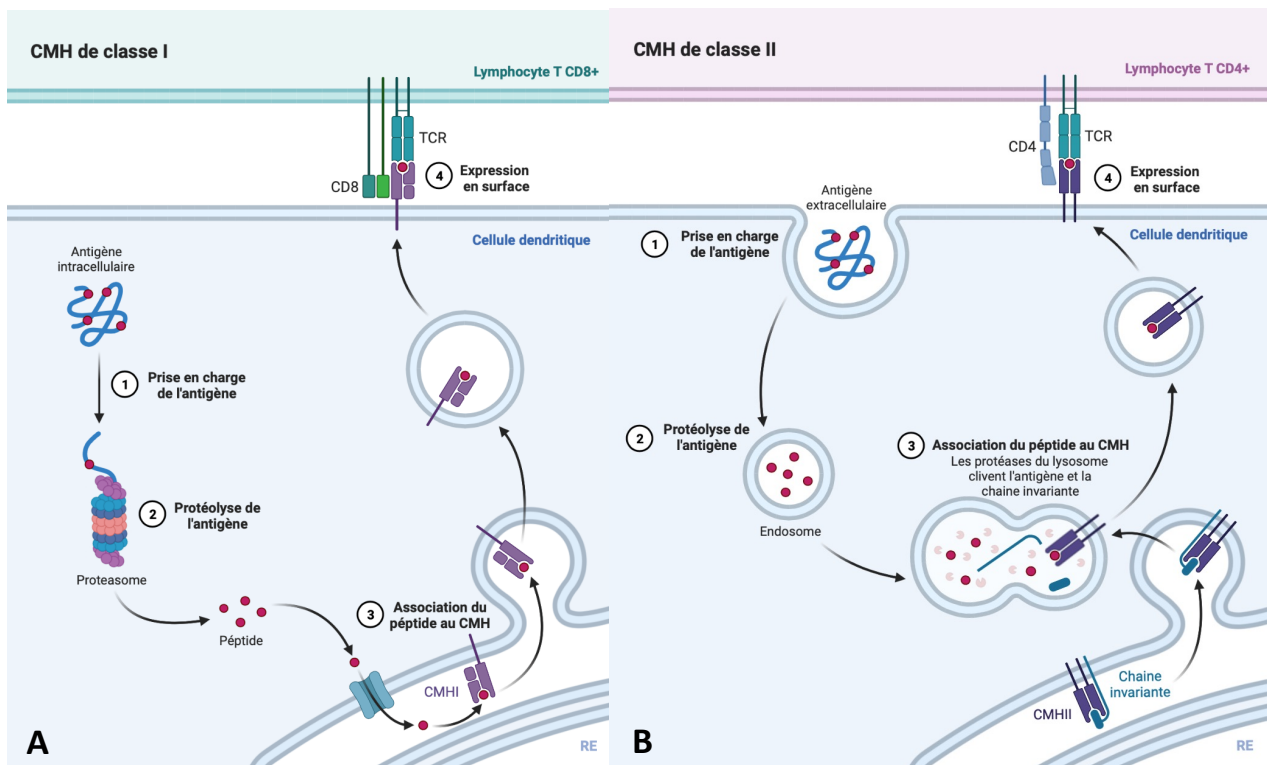


Figure 4 : Apprêtement et présentation d'un antigène par une DC pour l'activation d'un LT cytotoxique (A) ou helper (B). **A.** Les antigènes intracellulaires pouvant provenir de virus ou bactéries intracellulaires sont lysés par le protéasome sous forme de peptides antigéniques. Ces peptides sont associés au CMH I dans le réticulum endoplasmique (RE) avant que le complexe CMH I/peptide ne soit exprimé en surface. **B.** Après endocytose de l'antigène extracellulaire (e.g. bactérie extracellulaire), les protéines antigéniques se trouvant dans un endosome précoce puis tardif sont dégradés sous forme de peptides. Ceux-ci sont associés aux molécules de CMH II. Ce complexe CMH II/peptide est ensuite présenté à la surface de la cellule.

cytoplasmiques. Les molécules de costimulation quant à elles sont synthétisées *de novo* lors de l'activation/maturation des cellules (Winzler et al., 1997). De plus, non seulement l'activation des DC va leur conférer la capacité de présenter l'antigène aux LT CD4+ et de les activer, mais elle va aussi leur permettre de sécréter des cytokines adaptées à la mise en place d'une réponse permettant l'élimination spécifique du pathogène (Voir I.3.3.).

L'environnement cytokinique joue également un rôle important dans l'activation/maturation des DC. Les cytokines pro- et anti-inflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor (TNF), l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-6, l'IL-10, le Transforming Growth Factor β (TGF- β) produites par les cellules présentes sur le site inflammatoire (cellules stromales, cellules endothéliales) sont capables de moduler l'état d'activation/maturation des DC (Banchereau et al., 2000).

Une fois activées, les DC vont acquérir la capacité de migrer du site de l'inflammation vers les organes lymphoïdes secondaires par chimiotactisme, notamment grâce à l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 (Chemokine Receptor Type 7). CCR7 est capable de reconnaître spécifiquement la chimiokine CCL19 qui est fortement sécrétée dans les organes lymphoïdes secondaires où se trouvent de nombreux LT CD4+ (ganglions lymphatiques, rate) (Riol-Blanco et al., 2005). Ainsi, par chimiotactisme, les DC matures vont être attirées vers les organes lymphoïdes secondaires où elles pourront activer les LT CD4+. Cette migration n'est possible que par le remaniement du cytosquelette des DC (Winzler et al., 1997).

c. Régulation de l'activation/maturation des cellules dendritiques : voies de signalisation impliquées

La reconnaissance de PAMP par les TLR présents sur les DC va entraîner l'activation de nombreuses voies de signalisation complexes.

La fixation d'un ligand à la surface du TLR va aboutir au recrutement de MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) et TRIF (TIR domain-containing adaptator protein inducing IFN β), des protéines adaptatrices contenant des domaines TIR (Toll-Interleukin-1 Receptor) (Hemmi and Akira, 2005) (**Figure 5**). Le recrutement de ces protéines aboutit à l'activation de la voie NF κ B (Nuclear Factor kappa B) mais également des voies MAPK (Mitogen-activated protein kinases) comme ERK 1/2 (Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2), p38 et JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Banchereau et al., 2000). Des études ont montré que l'activation de NF κ B est responsable de l'augmentation de l'expression des marqueurs

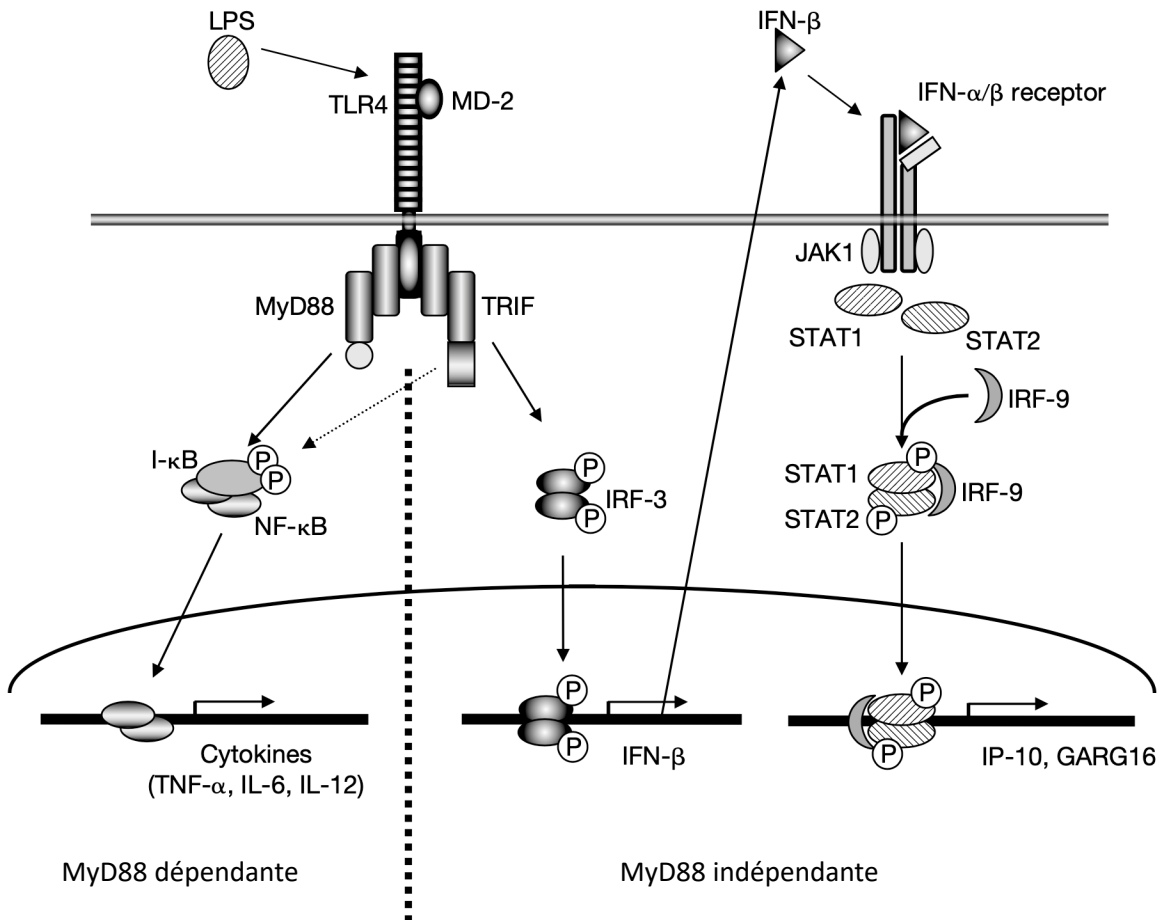


Figure 5 : Schéma d'activation du TLR4 par la voie dépendante ou indépendante de MyD88. La voie d'activation dépendante de MyD88 aboutit à une production de cytokines pro-inflammatoires *via* l'activation rapide de NFκB. Cependant cette voie n'est pas suffisante pour la production complète du cocktail de cytokines. La voie indépendante de MyD88 induit l'activation de TRIF puis du facteur IRF-3, un facteur de transcription permettant l'expression de l'IFNβ. L'IFNβ sécrété stimule alors son récepteur et induit l'activation de STAT1 et STAT2. Il en résulte une induction de gènes pro-inflammatoires. *Modifié d'après Hemmi et al., 2005.*

d'activation tels que le CMHII et les molécules de costimulation mais aussi des cytokines pro-inflammatoires (e.g. TNF, IL-6, IL-12). En revanche, l'activation de ERK joue un rôle dans la survie des cellules (Rescigno et al., 1998). En ce qui concerne l'activation de JNK, elle entraîne une surexpression des marqueurs d'activation mais pas du CMHII et a un rôle dans la régulation de la phagocytose. JNK est également responsable de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF α). Enfin, l'activation de p38 permet d'acquérir un phénotype mature et intervient dans la fonction des DC (Nakahara et al., 2004).

Dans le cas de l'activation des TLR, le facteur de transcription NF κ B est un dimère entre les sous-unités p50 et p65 (Rescigno et al., 1998). En étant transloqué au noyau, il est responsable de l'expression du TNF, de l'IL-6 ou encore de l'IL-12. Il a été montré que des souris déficientes en MyD88 ne sont pas capables de produire du TNF, de l'IL-6 ou de l'IL-12 après la stimulation de n'importe quel TLR. Ces souris présentent aussi un défaut d'activation des MAPK et de NF κ B suite à l'activation des TLR-2, 7 et 9 (Lund et al., 2004). En revanche, ce défaut n'est pas observé suite à l'activation des TLR-3 et 4 (Alexopoulou et al., 2001). De plus, l'expression de certaines cytokines telles que l'IFN β ou l'IP-10 est possible suite à la stimulation des TLR chez ces souris. Ces données suggèrent qu'il existe une signalisation indépendante de MyD88 pour l'activation de ces TLR. En effet, certains TLR sont également capables d'activer la protéine IRF-3 (Interferon Regulatory Factor 3). Cette dernière est un facteur de transcription activant l'expression de l'IFN β . La sécrétion de l'IFN β va alors activer, par l'intermédiaire de son récepteur, l'expression d'autres cytokines telle que l'IP10 (Sakaguchi et al., 2003). Ainsi, c'est en combinant la voie dépendante de MyD88 et la voie indépendante de MyD88 que les DC parviennent à acquérir pleinement leur phénotype mature qui va leur permettre d'effectuer leurs fonctions et notamment passer le relais à l'immunité adaptative.

3. L'immunité adaptative

3.1. Généralités

Quand la réponse immunitaire innée ne suffit pas pour éliminer le pathogène et maintenir l'homéostasie de l'organisme, une réponse immunitaire adaptative se met en place. Cette réponse est plus efficace car adaptée à la nature du pathogène, mais elle met plus de temps à s'installer. L'immunité adaptative est en partie déclenchée par les CPA telles que les DC. En effet, bien qu'elles fassent partie de l'immunité innée, les DC sont capables de faire le lien avec l'immunité adaptative. Une fois qu'elles ont rencontré et appréhété un antigène, les DC

matures migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) où elles vont présenter l'antigène et activer les LT, un premier acteur de la réponse adaptative. Les LB, le deuxième acteur de la réponse adaptative, sont quant à eux directement activés par la rencontre avec l'antigène.

3.2. *Les cellules de l'immunité adaptative : les lymphocytes*

3.2.1. Les lymphocytes B

a. Généralités

Les LB se trouvent principalement dans les organes lymphoïdes secondaires (e.g. rate, ganglions lymphatiques) et représentent 50 à 60% des splénocytes chez la souris. On retrouve aussi des LB dans la circulation sanguine (10 à 15% des cellules lymphocytaires sanguines chez la souris) (Choi et al., 2014). Les LB possèdent un récepteur membranaire nommé BCR (B Cell Receptor). Le BCR est une immunoglobuline membranaire. Les immunoglobulines peuvent être soit membranaires et constituer un récepteur, soit sécrétées et seront alors appelées anticorps. Les anticorps sont sécrétés par les plasmocytes issus de la différenciation des LB et permettent la neutralisation du pathogène avant son élimination. Le BCR du LB lui permet de reconnaître spécifiquement un antigène. Il s'en suit une différenciation en plasmocyte qui sécrètera des anticorps dirigés contre le pathogène en question.

b. Sous-populations de lymphocytes B

Il existe différents types de LB : les LB-1 et les LB-2 (Allman and Pillai, 2008; Mirzaei, 2022). Les LB-2 sont subdivisés en deux catégories : les LB folliculaires (LB FO) et les LB de la zone marginale (LB ZM). Ces deux sous-populations doivent leur nom à la zone des organes lymphoïdes secondaires dans laquelle ils résident. Ainsi, les LB FO se trouvent dans la zone folliculaire (Allman and Pillai, 2008). Ils sont spécialisés dans la réponse immunitaire T-dépendante c'est-à-dire que leur activation nécessite l'activation des LT CD4+. Bien que ces cellules puissent capter un antigène *via* leur BCR, leur pleine activation nécessite leur contact avec un LT CD4+ activé par ce même antigène. De cette manière, les LB FO activés vont aboutir à la formation d'un centre germinatif. Les LB ZM sont, quant à eux, localisés dans la zone marginale, c'est-à-dire juste en périphérie de la zone folliculaire (Martin and Kearney, 2002). Bien qu'ils puissent intervenir dans une réponse T-dépendante, les LB ZM sont spécialisés dans la détection des antigènes T-indépendants. Ainsi, ils sont capables de s'activer seuls suite à la rencontre avec un certain type d'antigène. Leur activation aboutit à leur différenciation en

plasmocytes sécréteurs d'anticorps mais de moindre affinité que ceux produits à partir des LB FO. Cependant, l'activation des LB ZM est plus rapide que celle des LB FO et constitue donc une première voie d'activation rapide de l'immunité spécifique (ZOUALI and RICHARD, 2011). Enfin, les LB-1 sont localisés dans les cavités péritonéales et pleurales. Ils contribuent tout comme les LB ZM à la réponse aux antigènes T-indépendants. Cette population de LB reste peu connue chez l'homme, les études disponibles ont été réalisées chez la souris (Davis, 2015; Martin et al., 2001).

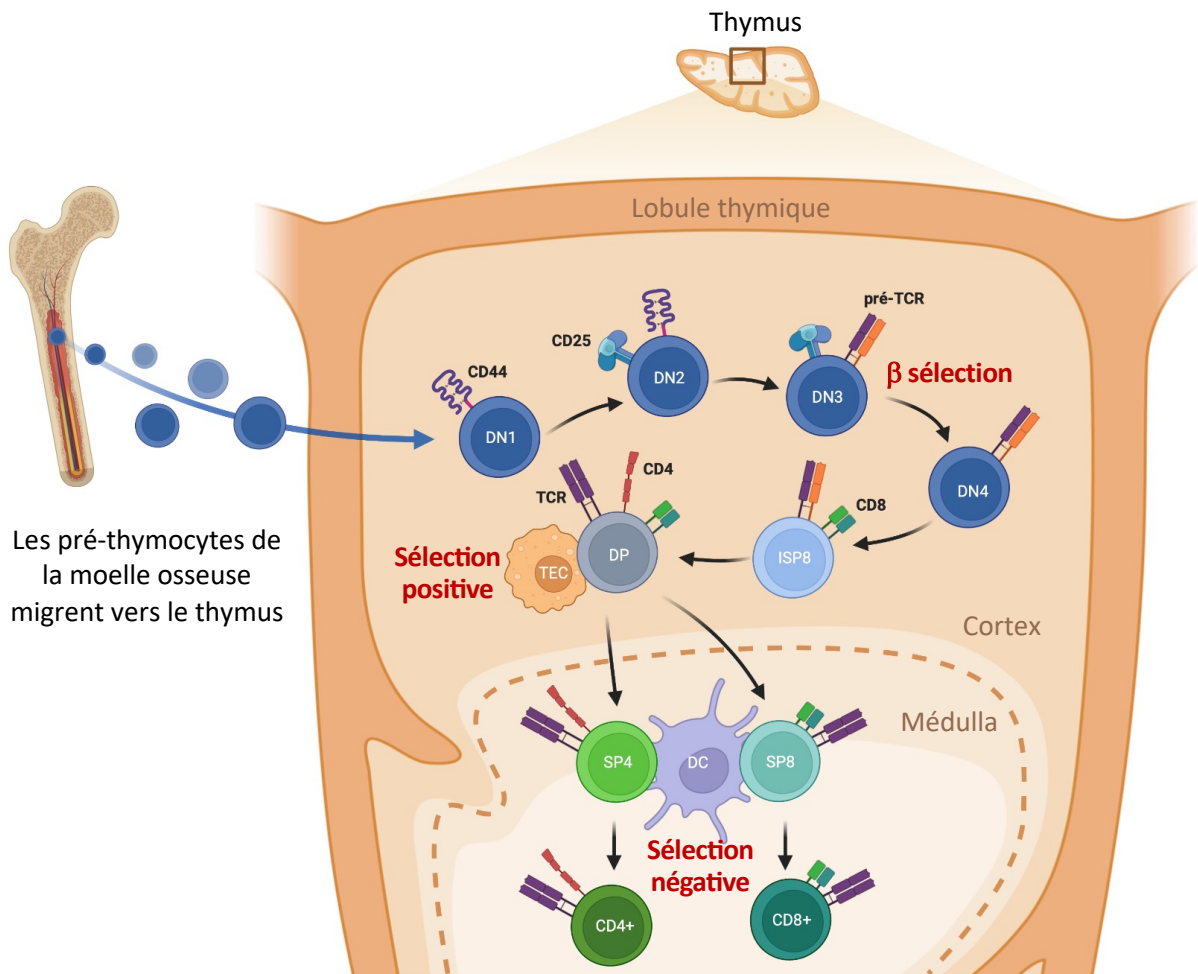
c. Activation, augmentation de la spécificité du BCR et mémoire immunitaire

Une fois activés, une partie des LB va se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps alors qu'une autre partie va se différencier en LB mémoire. Lors de leur activation, les LB vont former des centres germinatifs où ils vont se multiplier mais aussi augmenter la spécificité de leur BCR. Pour cela, ils vont subir des hypermutations somatiques et une commutation de classe. L'hypermutation somatique est un mécanisme permettant de créer des mutations aléatoires dans les domaines variables des immunoglobulines. La commutation de classe permet le changement de la partie constante des immunoglobulines et ainsi un changement de l'isotype. Ces deux processus ont pour but d'augmenter la spécificité du BCR/Anticorps vis-à-vis de l'antigène et d'adapter les fonctions effectrices. Les LB ayant une plus forte affinité pour l'antigène vont devenir des LB mémoire capables de persister dans l'organisme pendant une longue durée (plusieurs mois et années). Ce pool de LB mémoires permettra une réponse rapide en cas de deuxième infection par le même pathogène. En effet, les plasmocytes produits à partir de ce pool de LB mémoire seront produits rapidement et les anticorps qu'ils sécréteront auront une plus grande efficacité pour neutraliser le pathogène (Akkaya et al., 2020; Kurosaki et al., 2015).

3.2.2. Les lymphocytes T

a. Origine et maturation des lymphocytes T

Comme toutes les cellules immunitaires, les LT ont pour origine les CSH. Les CSH se trouvent dans le sac vitellin chez l'embryon, puis l'ébauche hépatique chez le fœtus et enfin dans la moelle osseuse des souris adultes (Eaves, 2015). Les CSH vont se diviser et se différencier en précurseurs des LT nommés pro-thymocytes. Ces cellules migrent vers le thymus sous l'effet des chimiokines CXCL12 et CCL25 où elles vont maturer en LT (Soldevila et al., 2004).



Les pré-thymocytes de la moelle osseuse migrent vers le thymus

Figure 6 : Lymphopoïèse T et mise en place du TCR. Les pré-thymocytes originaires de la moelle osseuse et arrivant au niveau du cortex thymique mûrissent en cellules doubles négatives (DN), c'est-à-dire qui n'expriment aucun des corécepteurs CD4 et CD8. Il existe 4 stades de DN reconnaissables par l'expression des marqueurs CD44 et CD25. Au stade DN3, la chaîne β du TCR est exprimée en surface associée à une pseudo chaîne α pour former un pré-TCR. L'activation du pré-TCR est essentielle au cours du processus de β sélection pendant lequel la fonctionnalité de la chaîne β est testée. Seules les cellules avec une chaîne β fonctionnelle survivent. Après le stade DN, les cellules se mettent à exprimer le corécepteur CD8 et deviennent des cellules immatures simples positives CD8 (ISP8). Au stade doubles positives (DP), les cellules expriment les deux corécepteurs, CD4 et CD8, et la pseudo-chaîne α est remplacée par la véritable chaîne α . La fonctionnalité du TCR est testée à ce stade lors de la sélection positive. Seuls les cellules DP dont le TCR est capable de reconnaître les complexes CMH/peptide présentés par les cellules épithéliales thymiques (TEC) survivent et poursuivent leur maturation. Ces cellules migrent vers la médulla où elles deviennent des cellules simples positives CD4+ (SP4) ou CD8+ (SP8). Les cellules SP4 et SP8 subissent ensuite une sélection négative permettant d'éliminer les cellules auto-réactives. Les cellules dont le TCR reconnaît avec une trop forte affinité le complexe CMH/peptide du soi présenté par les DC ou les TEC de la médulla reçoivent un signal de mort, les autres deviennent des LT CD4+ et CD8+ matures et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires.

Le thymus est composé de deux lobes comprenant des lobules. A l'intérieur d'un lobule se trouve une partie périphérique nommée cortex qui contient les thymocytes les moins matures. Plus en profondeur se trouve la médulla qui contient les thymocytes les plus matures. Les pro-thymocytes en provenance de la moelle osseuse colonisent le cortex et migrent vers la médulla. La migration des thymocytes est un processus complexe qui nécessite diverses chimiokines telles que CCR7, CCR9 et CCR4 (Krueger et al., 2010; Uehara et al., 2002; Ueno et al., 2004; Zlotoff et al., 2010). C'est au cours de cette migration que les cellules mûrissent en LT.

Les pro-thymocytes en provenance de la moelle osseuse subissent une maturation en différentes étapes (**Figure 6**). Chaque étape correspond à un type cellulaire qui peut être distingué des autres sous-populations par l'expression de marqueurs spécifiques. Dans le cortex, les pro-thymocytes vont mûrir en cellules doubles négatives (DN). Ces cellules portent ce nom car elles n'expriment ni CD4, ni CD8. Ces cellules DN vont ensuite exprimer de manière provisoire le CD8, on les appelle les cellules immatures simples positives CD8 (ISP8). Ces dernières vont ensuite exprimer en plus du CD8, le CD4 et seront donc double positives (DP). Les cellules DP migrent vers la médulla où elles perdent l'expression d'un corécepteur et deviennent simple positive CD4 (SP4) ou CD8 (SP8). Ces cellules matures vont ensuite quitter le thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules SP4 sont à l'origine des LT CD4+ et les SP8 des LT CD8+ (Dik et al., 2005; Scollay et al., 1984).

b. Le TCR, récepteur des lymphocytes T

Afin de reconnaître spécifiquement les antigènes, les LT possèdent des récepteurs membranaires appelés TCR (T Cell Receptor). Ces TCR sont composés de deux chaînes polypeptidiques. Chaque chaîne possède une région variable et une région constante. La région variable possède une séquence protéique et donc une structure acquise au cours de la maturation des LT qui est propre à chaque lymphocyte. Ces structures uniques permettent à aux LT de reconnaître spécifiquement une multitude d'antigènes différents. Le TCR n'est cependant pas capable de reconnaître seul un peptide antigénique. Ce dernier doit être présenté par une molécule du CMH présente à la surface des CPA.

Le TCR est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des immunoglobulines (**Figure 7**). Il est constitué de deux chaînes. Une chaîne légère qui peut être soit une chaîne α soit une chaîne γ , et une chaîne lourde qui peut être une chaîne β ou une chaîne δ (Chothia et al., 1988;

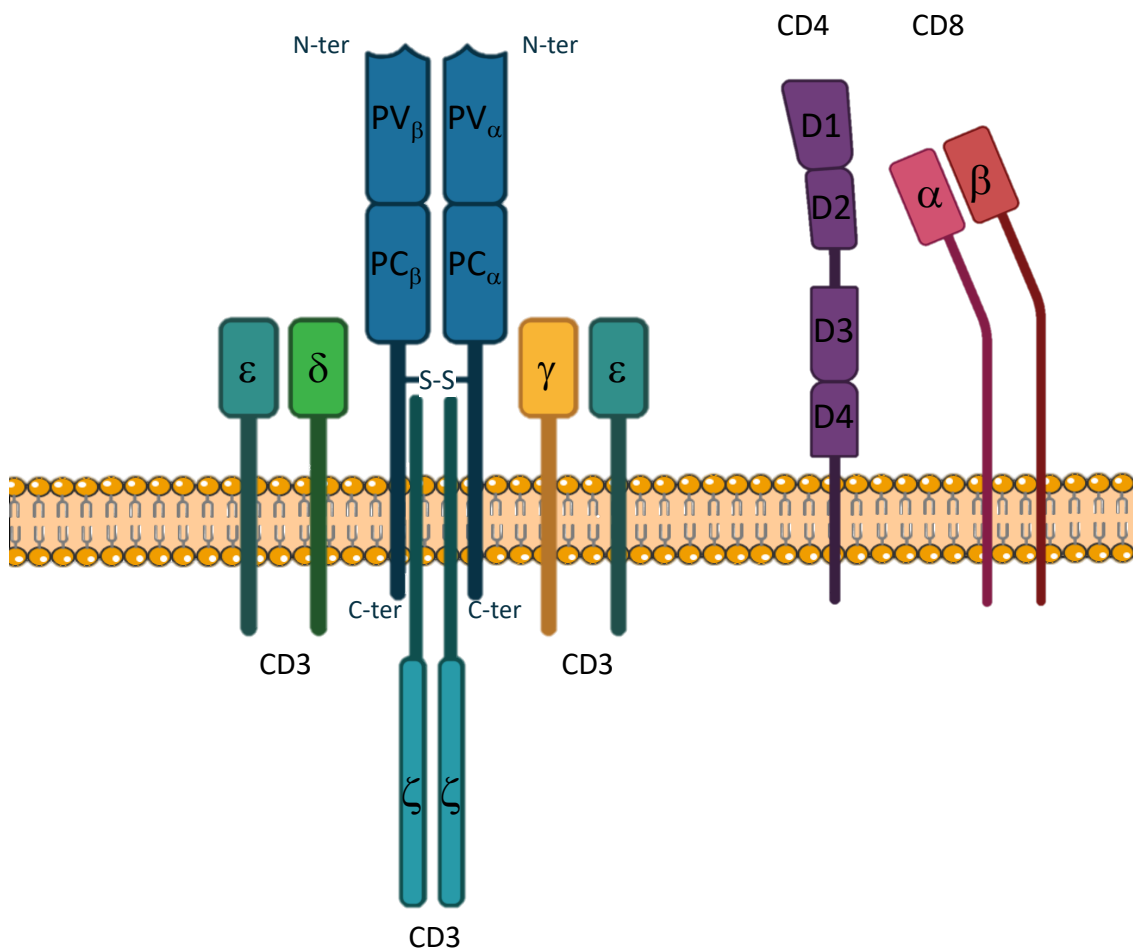


Figure 7 : Structure du TCR $\alpha\beta$ et de ses corécepteurs. Le TCR $\alpha\beta$ est constitué d'une chaîne légère α et d'une chaîne lourde β qui s'associent entre elles par l'intermédiaire d'un pont disulfure. Les deux chaînes du TCR sont dotées d'une partie hydrophobe en N-terminal leur permettant d'être ancrées à la membrane. Le reste du récepteur est hydrophile et se retrouve à l'extérieure de la cellule. Les chaînes lourdes et les chaînes légères des TCR sont constituées d'un domaine N-terminal variable (V) et d'un domaine C-terminal constant (C). La partie constante a une fonction structurale. La partie variable, quant à elle, possède trois domaines hypervariables nommés 'Complementarity Determining Regions' (CDR). Les régions CDR1 et CDR2 interagissent avec le CMH alors que la région CDR3 interagit directement avec le peptide. La séquence peptidique de cette partie est le résultat de la recombinaison V(D)J. Afin d'assurer la transduction du signal, le TCR est associé à un corécepteur CD3 composé de deux chaînes ϵ , une chaîne δ , une chaîne γ et deux chaînes ζ . Les corécepteurs CD4 et CD8 sont présents, respectivement, sur les LT helper et les LT cytotoxiques. Ils interagissent avec le complexe CMH/peptide et permettent la pleine activation du LT.

Hannum et al., 1984). Pour former le TCR, une chaîne lourde s'hétérodimérise avec une chaîne légère pour former soit un TCR $\alpha\beta$ (95% des TCR), soit un TCR $\gamma\delta$ (5% des TCR). Les LT possédant un TCR $\gamma\delta$ ont un rôle spécifique dans les muqueuses intestinales et respiratoires (McCarthy and Eberl, 2018). L'objet de notre étude se concentrant sur les TCR $\alpha\beta$, les TCR $\gamma\delta$ ne seront pas présentés ici.

Le TCR ne possède pas de domaine de transduction de signal. Il est donc nécessairement associé à des corécepteurs qui permettent de traduire la détection de l'antigène en signal intracellulaire. Le TCR est associé aux corécepteurs CD3 et CD4 ou CD8. Le complexe CD3 est composé de six chaînes différentes. Une chaîne CD3 ϵ interagit avec CD3 δ , une deuxième chaîne CD3 ϵ interagit avec une chaîne CD3 γ et deux chaînes CD3 ζ interagissent ensemble (Call and Wucherpfennig, 2005; Germain and Stefanová, 1999; Samelson, 2002). La reconnaissance d'un complexe CMH/peptide antigénique par le TCR va entraîner la phosphorylation des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif) présents sur les chaînes CD3. C'est cette phosphorylation qui constitue la première étape de transduction du signal (Weiss and Littman, 1994). Les corécepteurs CD4 et CD8 sont présents sur les LTh ou LTc respectivement. Ce sont également des glycoprotéines transmembranaires possédant un domaine intracellulaire et extracellulaire. Le corécepteur CD8 des TCR $\alpha\beta$ est un homodimère composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . Le corécepteur CD4 est composé d'une seule chaîne composée de plusieurs domaines D1, D2, D3 et D4. Lors de la formation de la synapse immunologique, les corécepteurs CD4 ou CD8 vont interagir avec les molécules de CMHII ou CMHI respectivement. Cette interaction permet le recrutement de Lck, une kinase permettant la phosphorylation de CD3 et donc l'initiation de la transduction du signal (Li and Mariuzza, 2013; Mørch et al., 2020).

Ainsi, le TCR possède une structure complexe qui permet l'activation des LT. Cette structure complexe est capable de reconnaître tout type d'antigène et chaque TCR présent sur chaque LT est spécifique à un antigène donné. Cette spécificité est acquise au cours du développement des LT, la lymphopoïèse T.

c. Mise en place du TCR et sélection des lymphocytes T

Aux stades DN de la maturation a lieu une étape clef de la vie des LT : la mise en place du TCR (**Figure 6**). Les cellules DN peuvent être divisées en quatre sous-populations reconnaissables

par l'expression ou non de CD44 (important pour la migration et la différenciation) et CD25 (récepteur à l'IL-2 intervenant dans la survie cellulaire) (Cong et al., 2016; Föger et al., 2000). On distingue les cellules DN1 (CD44+CD25-), DN2 (CD44+CD25+), DN3 (CD44-CD25+) et DN4 (CD44-CD25-). C'est aux stades DN2 et DN3 que se fait l'assemblage de la chaîne lourde du TCR (Outters et al., 2015). Au stade DN3, les chaînes du corécepteur CD3 sont assemblées et la chaîne β du TCR est exprimée en surface en association avec une pseudo-chaîne α . Cet ensemble constitue le pré-TCR indispensable au processus de β sélection (Taghon et al., 2006). Ce processus permet de stopper la maturation des cellules et de les éliminer par apoptose si elles possèdent un pré-TCR non fonctionnel, c'est la mort par négligence. Seules les cellules ayant une chaîne β fonctionnelle vont être capables d'activer le pré-TCR qui émettra un signal de survie et permettra aux cellules de passer au stade DN4. La mise en place du TCR se termine au stade DP où la pseudo chaîne α est remplacée par la véritable chaîne α (von Boehmer, 2005).

Les gènes de TCR sont produits par un mécanisme génétique faisant intervenir le hasard que nous décrivons à la section suivante (Voir 1.3.2.2.d.). Les TCR sont donc théoriquement capables de reconnaître n'importe quel antigène y compris les antigènes du soi (antigènes issus des différentes molécules de l'organisme). Il convient donc de s'assurer que ces LT, dits auto-réactifs car ils possèdent un TCR dirigé contre un antigène du soi, soient éliminés pour éviter l'apparition de maladies auto-immunes. Pour cela, deux mécanismes se déroulant pendant la maturation des LT existent : la sélection positive et la sélection négative (Klein et al., 2009; Kondo et al., 2019). La sélection positive se déroule au stade DP. Dans le cortex, les TEC (cellules épithéliales corticales thymiques) expriment de nombreuses molécules de CMH associées à différents peptides du soi. Seules les cellules DP qui reconnaissent ces complexes CMH/peptide du soi reçoivent un signal de survie et continuent leur maturation, les autres meurent par apoptose. Cette étape permet à l'organisme de s'assurer que le TCR est bien capable de reconnaître le CMH de l'organisme. Près de 80% des thymocytes sont éliminés au cours de cette sélection positive (Klein et al., 2009; Yates, 2014). Cependant, cette sélection positive engendre la production de nombreux TCR auto-réactifs. Pour pallier cela, les cellules SP subissent une sélection négative dans la médulla. Les TEC médullaires et les cellules dendritiques du thymus vont à nouveau présenter un complexe CMH/peptide du soi aux thymocytes en cours de maturation. Les cellules qui reconnaissent avec une trop grande

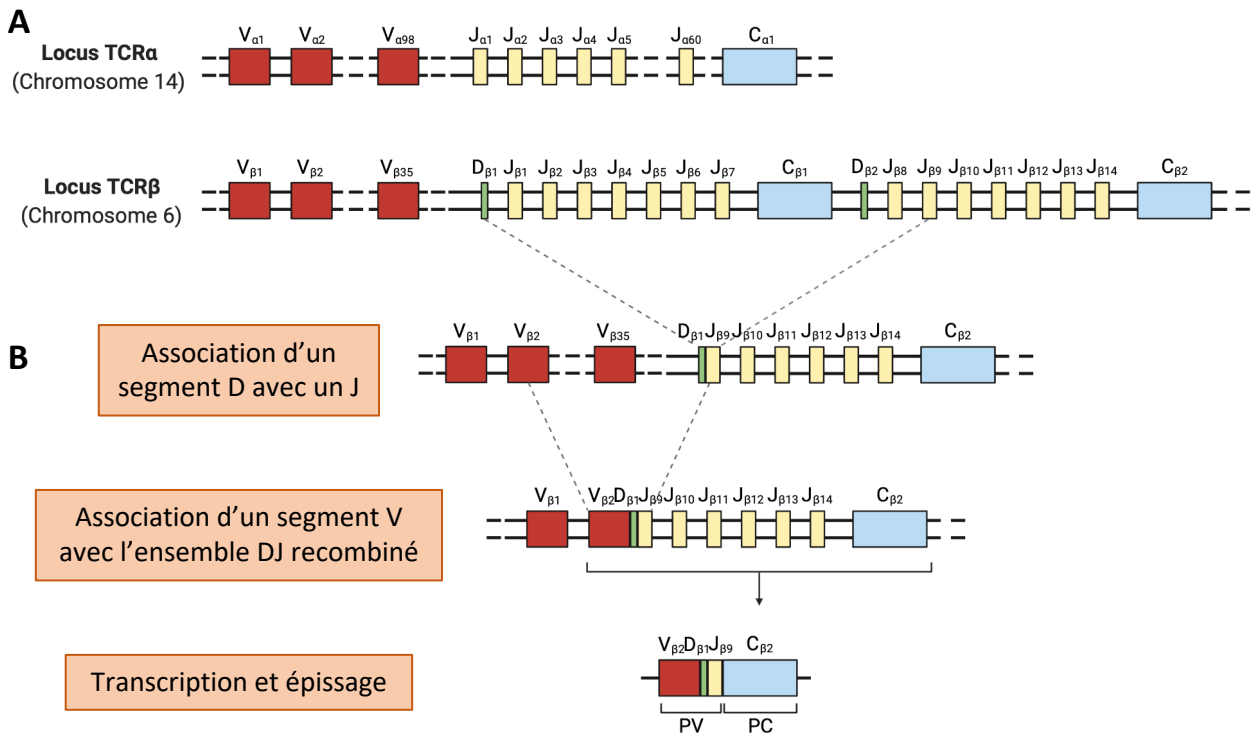


Figure 8 : Structure et recombinaison des loci de TCR murins. A. Les segments géniques non réarrangés des loci TCR présents sur les chromosomes 14 et 6 possèdent plusieurs segments V (variable), D (diversité), J (jonction) et C (constant). Ces segments une fois réarrangés permettent la production d'une grande diversité de TCR. **B.** Le réarrangement de la chaîne β débute par l'association d'un segment D avec un segment J puis le réarrangement d'un segment V avec l'ensemble DJ recombiné. Une fois transcrit, les segments J supplémentaires sont éliminés par épissage et l'ensemble VDJ est associé au segment C. La traduction de cet ARNm entraîne la formation de la chaîne β du TCR dont la partie VDJ est à l'origine de la partie variable (PV) et la région C de la partie constante (PC). Le réarrangement de la chaîne α du TCR est identique mais il n'y a pas de segment D.

affinité ce complexe vont recevoir un signal de mort (Kondo et al., 2019). De cette manière, l'organisme met en place une tolérance envers lui-même, c'est ce qu'on appelle la tolérance centrale.

d. Création de la diversité du répertoire de TCR : la recombinaison V(D)J

- *Généralités*

Comme décrit précédemment, la structure de chaque TCR présent à la surface d'un LT est spécifique à un antigène. Il existe donc des mécanismes permettant à l'organisme de produire une grande diversité de TCR afin de lui permettre de faire face à la très grande diversité d'antigènes qu'il est susceptible de rencontrer. On parle de répertoire de TCR. Le mécanisme de création de ce répertoire est le mécanisme de recombinaison V(D)J. Il correspond à un mécanisme de réarrangement de segments géniques codant le TCR. Chez la souris, le locus codant la chaîne α est localisé sur le chromosome 14 et celui codant la chaîne β est localisé sur le chromosome 7 (Giudicelli et al., 2005). Ils comportent tous les deux plusieurs segments V (Variables), D (Diversité, uniquement pour la chaîne β), J (Jonction) et C (Constant). Le principe de la recombinaison V(D)J est de réarranger de manière plus ou moins aléatoire cette partie de génome en associant un segment V, un D (uniquement pour la chaîne β), et un J (**Figure 8**). La partie variable d'une chaîne lourde de TCR sera formée à partir d'un segment V, D et J ; la partie variable d'une chaîne légère sera formée à partir d'un segment V et J (Bassing et al., 2002). Ces parties variables sont suivies d'une partie constante codée par le segment C. Ainsi, on estime que la recombinaison V(D)J est capable de produire 10^{15} TCR $\alpha\beta$ différents (Davis and Bjorkman, 1988).

- *Mécanisme moléculaire de la recombinaison V(D)J*

La recombinaison V(D)J comporte quatre étapes : l'initiation de la recombinaison, le recrutement du système de réparation NHEJ (Non-Homologous End Joining), la création de la diversité de jonction et la réparation des brins d'ADN (**Figure 9**).

L'initiation de la recombinaison est possible grâce aux séquences signaux de recombinaison (ou RSS) situés à l'extrémité 3' des segments V, de part et d'autre des segments D et en 5' des segments J. Ils sont constitués d'un heptamère et d'un nonamère séparés par un espaceur de 23 (RSS-23) ou 12 (RSS-12) nucléotides. Les segments V β sont associés à un RSS-23, les

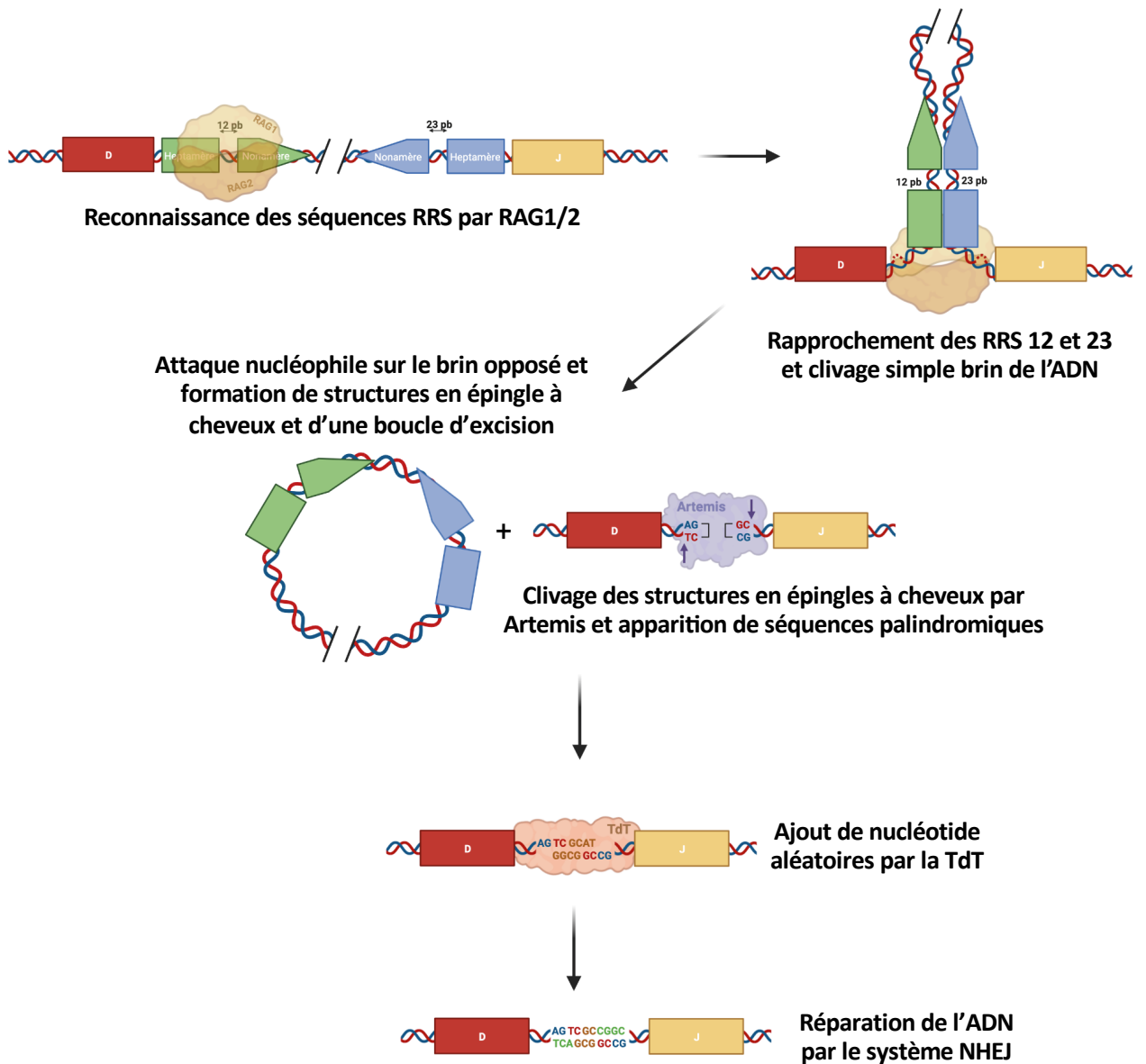


Figure 9 : Mécanisme moléculaire simplifié de la recombinaison V(D)J. Les protéines RAG 1 et 2 initient la recombinaison V(D)J en reconnaissant et en rapprochant une séquence RSS 12 (Recombination Start Site) avec une séquence RSS 23. Le complexe RAG1/2 clive l'ADN de manière simple brin formant une extrémité 3'OH libre qui fait une attaque nucléophile sur le brin opposé. Ceci entraîne la formation de structures en épingle à cheveux et d'une boucle d'excision. Les séquences en épingle à cheveux sont reconnues par le système de réparation NHEJ (Non-Homologous End-Joining) et Artémis clive ces structures de manière à faire apparaître des structures palindromiques. La TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) ajoute des nucléotides aléatoires aux extrémités 3' libres et le système NHEJ fini par recruter des polymérase de la famille pol X ainsi qu'un complexe de ligation (XRCC4-DNA ligase IV) afin de finaliser la recombinaison.

segments D β à un RSS-12 en 5' et un RSS-23 en 3', et les segments J β à un RSS-12 (Bassing et al., 2002). Ces séquences RSS vont être reconnues par les nucléases RAG1 et RAG2 qui vont s'y fixer. Cette fixation va induire l'hybridation d'un RSS-23 avec un RSS-12. C'est ce qu'on appelle la règle du 12/23 (Tonegawa, 1983). Ainsi, il est impossible que deux segments possédant le même espaceur s'hybrident et la recombinaison ne peut pas s'effectuer entre segments de même type (Lu et al., 2008). Les protéines RAG vont réaliser une coupure simple brin de l'ADN entre la séquence RSS et la séquence codante. Cette coupure entraîne la formation d'une extrémité 3'OH libre qui va réagir avec le brin opposé par transestérification pour former une structure en épingle à cheveux au niveau des séquences codantes et des bouts francs aux extrémités des séquences RSS.

Cette cassure de l'ADN va causer le recrutement du système de réparation NHEJ (Brandsma and Gent, 2012). Ce système complexe va permettre la reconnaissance de la cassure et dans un premier temps la ligation des bouts francs de la séquence non codante, ce qui aboutira à la formation d'une boucle d'excision. Les structures en épingle à cheveux vont être prises en charge par le complexe Artemis/DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) qui a une activité endonucléase (Ma et al., 2002; Malu et al., 2012). La coupure des structures en épingle à cheveux par ce complexe va créer des séquences palindromiques au niveau des jonctions V-D et D-J (ou V-J pour les chaînes α).

La TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) est une ADN polymérase qui ajoute des nucléotides de manière aléatoire aux extrémités 3' libres des séquences codantes. Cette addition de nucléotides augmente la diversité du répertoire de TCR. Ce processus est nommé diversité de jonction (Mahajan et al., 1999). Les enzymes RAG et Artémis participent également à cette diversité de jonction. En effet, ces dernières sont des endonucléases imprécises aboutissant à la création de séquences codantes uniques. Il est à noter que cette imprécision de jonction peut parfois être à l'origine de TCR non fonctionnels. En effet, il est possible que les protéines RAG, Artemis ou TdT soient à l'origine d'un décalage du cadre de lecture qui peut aboutir à l'apparition d'un codon stop ou de la modification de la séquence de la région constante, aboutissant alors à la production d'un TCR non fonctionnel (Malu et al., 2012).

La recombinaison V(D)J se termine par le recrutement d'une polymérase de la famille des Pol X puis du complexe XRCC4-DNA ligase IV. La polymérase va ajouter les nucléotides manquants

à l'opposé de ceux ajoutés par la TdT et le complexe DNA ligase va lier les segments V-D et D-J (ou V-J pour les chaînes α).

- *Régulation de la recombinaison V(D)J*

La recombinaison V(D)J est un mécanisme faisant intervenir des cassures de l'ADN et est donc potentiellement dangereux. Tout dysfonctionnement de la recombinaison V(D)J est à l'origine de maladies immunitaires comme des déficits immunitaires ou des lymphomes (Bassing et al., 2002). Pour cette raison, il existe de nombreux mécanismes de régulation.

Le premier mécanisme de régulation est la règle 12/23 exposée précédemment et qui conditionne le recrutement des protéines RAG. Grâce aux RSS-12 et RSS-23, la recombinaison entre les segments de même nature est rendue impossible ce qui évite les recombinaisons aberrantes (Tonegawa, 1983). De plus, la nature même de la séquence des RSS est importante. En effet, lors de la recombinaison de la chaîne β , le segment V ne se réarrange pas avec le segment J, malgré la compatibilité des RSS en 3' du segment V et en 5' du segment J. Cela est dû à la séquence du RSS situé en 5' du segment D qui réarrange préférentiellement avec le RSS en 3' du segment V. Ce mécanisme force l'utilisation du segment D lors du réarrangement des chaînes β (Bassing et al., 2000; Sleckman et al., 2000).

Un deuxième mécanisme de régulation est la régulation transcriptionnelle des protéines RAG. Afin de limiter les dommages que pourrait entraîner une trop forte expression des protéines RAG, ces dernières sont hautement régulées au cours de la lymphopoïèse. Ainsi, la transcription des gènes RAG est exclusivement limitée au cours du réarrangement des chaînes β puis α (Nagaoka et al., 2000). Il existe différents acteurs qui permettent une telle régulation transcriptomique tel que D3, un élément de réponse à C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein alpha), activant le promoteur de RAG2 ou ASE (Anti Silencing Element) (Kuo and Schlissel, 2009; Wei et al., 2002).

L'accessibilité des loci codant le TCR est indispensable pour le mécanisme de recombinaison V(D)J. Dans une cellule, l'ADN est sous forme compactée et il existe des mécanismes appelés mécanismes épigénétiques permettant de décompacter certaines zones. Ces mécanismes sont décrits dans la section II.1. Dans le cas de la recombinaison V(D)J, la décompaction de l'ADN est nécessaire au choix des segments V, D et J. Cette décompaction se fait par différents mécanismes. Deux modifications aboutissant à une décompaction sont par exemple la

triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) ou la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) (Lennartsson and Ekwall, 2009). Cette décompaction rend accessible le locus TCR, ce qui rend possible le recrutement de la machinerie de réarrangement (Matthews et al., 2007). De plus, cette décompaction a pour conséquence de rendre actif le promoteur en amont du segment V choisi. Il en découle une transcription non fonctionnelle du segment V qui génère des transcrits germinatifs (Abarategui and Krangel, 2009).

Le dernier mode de régulation de la recombinaison V(D)J est nommée exclusion allélique. Ce processus permet au lymphocyte de n'exprimer qu'un seul TCR malgré le fait que le locus TCR est présent sur les deux exemplaires de chromosomes. Ainsi, lors du réarrangement de la chaîne β , un des deux chromosomes est choisi au hasard et si la chaîne produite est fonctionnelle, le second chromosome ne sera pas recombiné. Si à l'inverse la chaîne est non fonctionnelle, le deuxième chromosome sera recombiné. Si cette fois-ci la chaîne β est fonctionnelle, la cellule survit, sinon elle meurt par apoptose. Ensuite, ce processus est répété pour la chaîne α . Ce mécanisme d'exclusion allélique est possible par la diminution de l'accessibilité des protéines RAG sur le deuxième chromosome (Brady et al., 2010).

e. Fonctions, activation et mémoire immunitaire des lymphocytes T

Chez la souris, les LT représentent 30% des cellules de la rate et environ 70% des cellules circulantes (Choi et al., 2014). Il existe deux types de LT qui ont deux rôles distincts. Les LT CD8⁺ ou LT cytotoxiques (LTc) sont des cellules capables de lyser les cellules infectées par des virus ou bactéries intracellulaires ou encore des cellules cancéreuses. Pour cela, ils possèdent des vésicules renfermant des perforines et granzymes induisant la mort des cellules anormales. Les LTc sont caractérisés par la production d'IFN γ et de TNF α (Andersen et al., 2006). La seconde population de LT est la population de LT CD4⁺ aussi appelés LT helper (LTh). Ce sont des cellules qui une fois actives et polarisées (Voir 1.3.3.) sécrètent des cytokines stimulant l'activation des LB, des LTc et des cellules de l'immunité innée (Annunziato et al., 2015; Kaiko et al., 2008). L'activation des LT est possible grâce aux cellules présentatrices d'antigènes et est décrite à la section suivante (1.3.3.).

De la même manière que pour les LB, une partie des LT activés va se différencier en LT mémoire. Environ 5 à 10% des LT activés vont se différencier en LT mémoires pendant que la

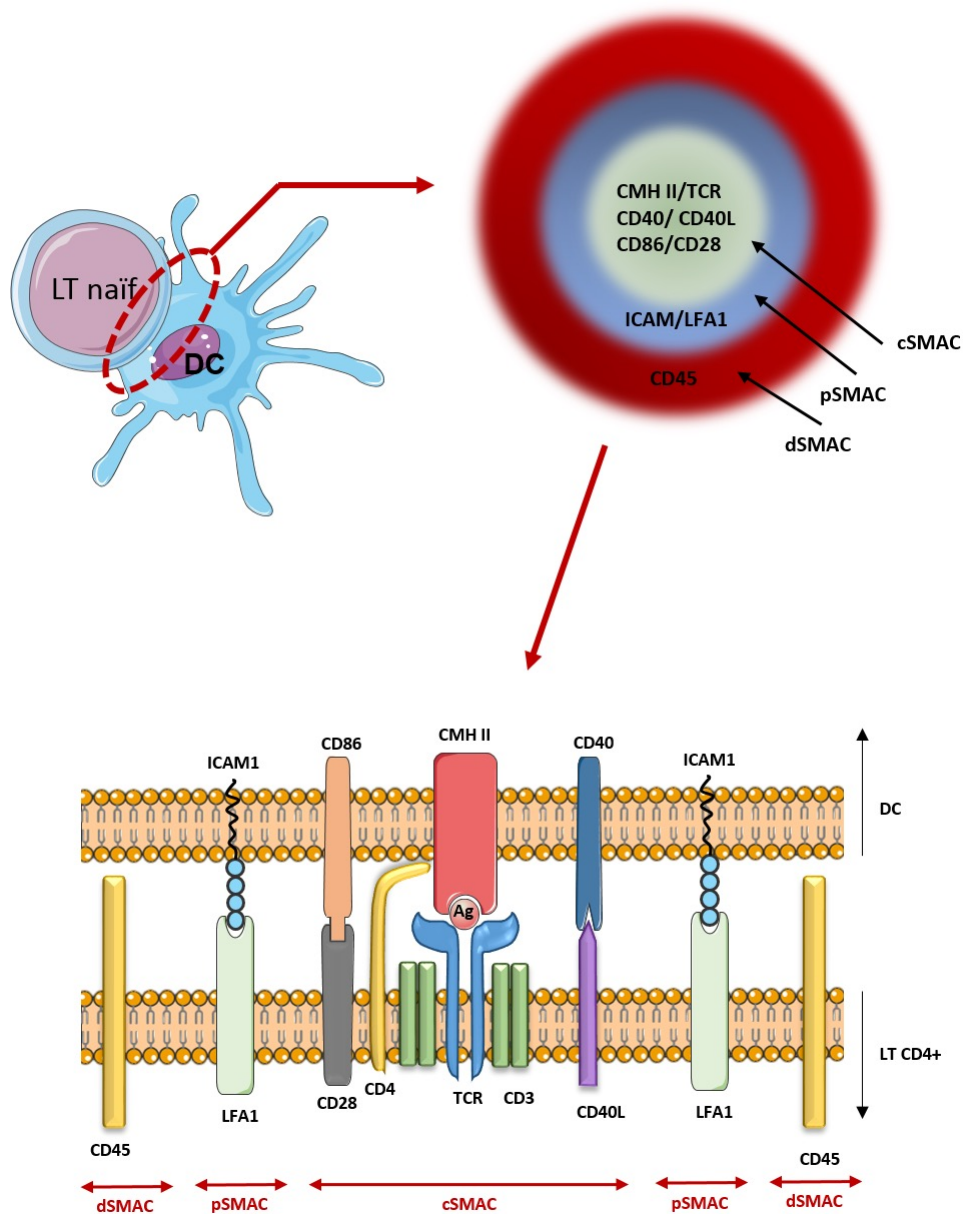


Figure 10 : Formation de la synapse immunologique entre un LT CD4+ et une DC.

L'activation des LT CD4+ est assurée par les DC grâce à la formation de la synapse immunologique ou SMAC (Supra Molecular Adhesion Complex). Celle-ci est composée de 3 zones concentriques : le SMAC central (cSMAC), le SMAC périphérique (pSMAC) et le SMAC distal (dSMAC). Chacune de ces zones regroupe des interactions entre protéines membranaires permettant d'activer les LT et de stabiliser la liaison DC-LT.

TCR : T Cell Receptor. CD : Cluster de Différenciation. LFA1 : Lymphocyte Function-Associated Antigen 1. ICAM1 : Intercellular Adhesion Molecule1. CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II. Ag : Peptide antigénique.

grande majorité va mourir après avoir éliminé le pathogène. Les signaux que reçoivent ces LT afin de subsister en tant que LT mémoire ne sont pas encore très clairs. Il semblerait qu'il y aurait intervention de facteurs de transcription comme Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) qui serait régulé pendant la polarisation des LT (Rutishauser et al., 2009). Le pool de LT mémoires ainsi créé permettra une réponse plus rapide en cas de deuxième contact avec le même antigène (Chen et al., 2018). Il existe quatre types de LT mémoires :

- Les Tscm (stem memory T cells) permettent de reconstituer rapidement le spectre de LT mémoires et effecteurs en cas de deuxième infection.
- Les Tem (effector memory T cells) ont une action cytotoxique et permettent de combattre rapidement le pathogène.
- Les Tcm (central memory T cells) ont une action de soutien de la réponse immunitaire en la rendant plus efficace et en promouvant la multiplication des Tem.
- Les Trm (tissue-resident memory T cells) sont présents dans les tissus et ont une action rapide contre les pathogènes traversants les barrières physiques.

Mis à part les Trm qui sont présents dans les tissus, la majorité des LT mémoires se retrouvent dans les organes lymphoïdes secondaires et dans le sang (Mirzaei, 2022).

3.3. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative

3.3.1. Présentation antigénique et activation des lymphocytes T

Bien qu'étant des cellules de l'immunité innée, les DC jouent un rôle important dans l'activation de la réponse adaptative. Après leur activation/maturation, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter l'antigène aux LT CD4⁺ ou aux LT CD8⁺ (cross présentation). Les LT et les DC vont entrer en contact et former une zone de contact très étroite appelée synapse immunologique ou SMAC (Supra Molecular Adhesion Complex) (Monks et al., 1998) (**Figure 10**). La formation de la synapse immunologique est essentielle pour l'activation des LT. Nous nous attarderons ici sur la formation d'une synapse immunologique entre DC et LT CD4⁺.

Les LT CD4⁺ et les DC vont tout d'abord entrer en contact par le biais de molécules d'adhésion. Au cours du rapprochement, le TCR présent à la surface des LT CD4⁺ va chercher à entrer en contact avec une molécule de CMHII présente sur la DC. Une fois ce contact établi, la synapse

se met en place (Lin et al., 2005; Onnis and Baldari, 2019). Elle est constituée de trois zones concentriques distinctes (Lin et al., 2005) :

- La zone centrale, nommée c-SMAC (central-SMAC), regroupe les interactions entre le complexe CMHII/peptide antigénique situé sur les DC et le TCR présent sur les LT CD4+. Cette zone comprend également les molécules de costimulation CD80/CD86 et CD40 situées sur les DC qui interagissent, respectivement, avec CD28 et CD40L situés sur les LT CD4+. L'ensemble de ces interactions va permettre la pleine activation des LT CD4+.
- La zone périphérique, nommée p-SMAC (peripheral-SMAC), permet de stabiliser la synapse immunologique grâce à la liaison entre les intégrines LFA-1 (Lymphocyte Function-Associated Antigen 1) et ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1).
- Une troisième zone, nommée d-SMAC (distal-SMAC), est composée de molécules plus diverses telles que CD45 et assure un contact plus stable et prolongé entre DC et LT CD4+.

La synapse immunologique va permettre aux LT CD4+ d'avoir les trois signaux indispensables à leur activation. Tout d'abord le contact entre le TCR et le complexe CMHII/peptide antigénique (1^{er} signal). Ensuite, le contact entre les molécules de costimulation CD80/CD86 et CD40 avec respectivement CD28 et CD40-L (2^{ème} signal). Enfin, les LT CD4+ ont besoin d'un cocktail de cytokines apporté par les DC comme l'IL-12, l'IL-4, et le TNF (3^{ème} signal) (Lutz, 2016). Une fois activés, les LT CD4+ vont se polariser en une sous-population particulière adaptée à la nature de l'antigène.

L'activation des LT CD8+ est quasiment la même que celle des LT CD4+. La principale différence est que le TCR présent à la surface des LT CD8+ reconnaît un peptide antigénique présenté par le CMHI alors que les LT CD4+ reconnaissent les peptides antigéniques couplés au CMHII. Ainsi, Les LT CD4+ seront activés uniquement par les CPA professionnelles (e.g. DC, macrophages), seules cellules à présenter les molécules de CMHII, alors que les LT CD8+ peuvent être activés par toutes les cellules de l'organisme puisqu'elles présentent toutes des molécules de CMHI. L'activation des LT CD8+ par les DC est appelée présentation croisée (cross presentation) (Corthay, 2009; Kaiko et al., 2008).

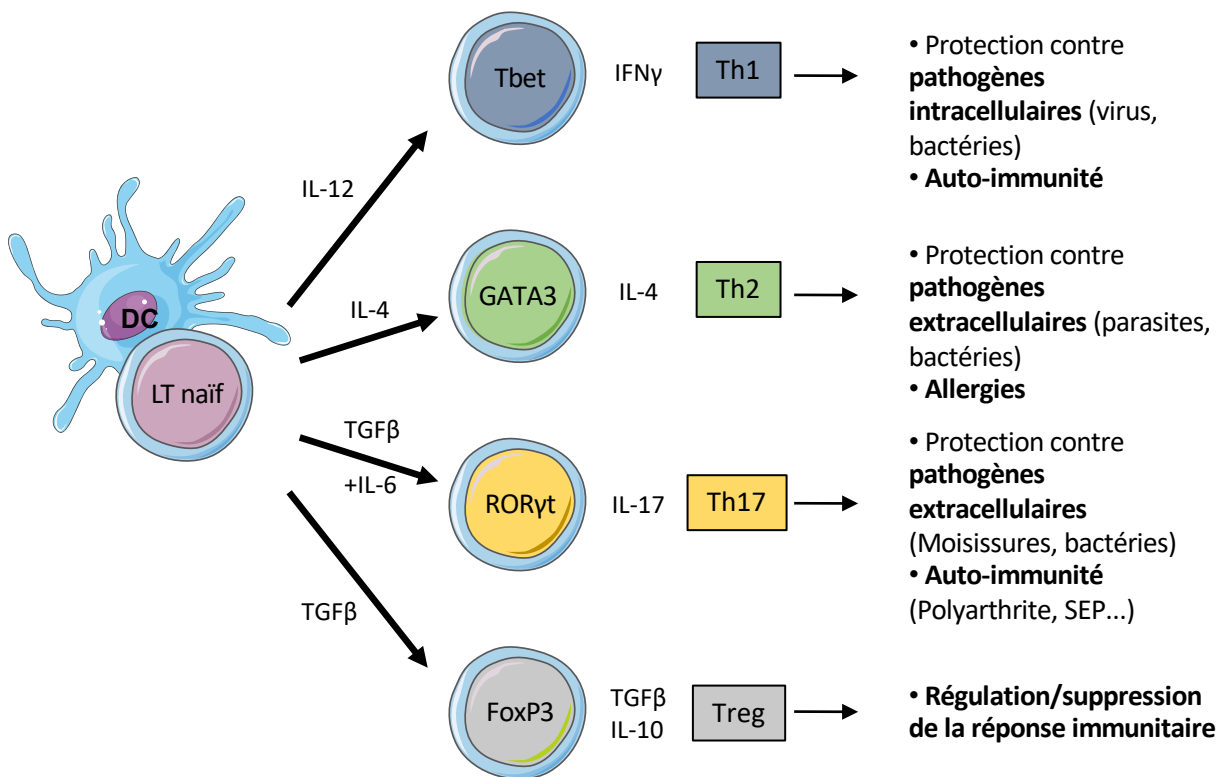


Figure 11 : Polarisation des LT CD4+. La différenciation des LT CD4+ naïfs en LT matures dépend du type de cytokines pro- ou anti-inflammatoires sécrétées par les DC et de l'antigène rencontré. Les DC vont permettre la différenciation des LT CD4+ naïfs en différentes sous-populations de LT CD4+ adaptés à l'antigène caractérisées par l'expression de facteurs de transcription spécifiques (Tbet, GATA3, ROR γ t, FoxP3) et la sécrétion de cytokines particulières.

3.3.2. Polarisation des lymphocytes T CD4+

Les DC activent les LT CD4+ grâce à un contact physique mais également grâce à la sécrétion de cytokines. En fonction de l'antigène qu'elles ont capté et de l'environnement cytokinique, les DC sont capables de sécréter des cytokines différentes et ainsi d'orienter la polarisation des LT CD4+ vers des profils immunogènes (Th1, Th2 et Th17) ou tolérogènes (LT régulateur (Treg)) (Banchereau et al., 2000). Les différentes sous-populations de LT CD4+ auront une fonction spécifiquement adaptée au pathogène. Elles sont caractérisées par l'expression de facteurs de transcription spécifiques et la production de cytokines particulières (Kaiko et al., 2008) (**Figure 11**).

La polarisation vers un profil Th1 est possible lorsque les LT CD4+ captent de l'IL-12 (Trinchieri, 2003). L'IL-12 est produite par les DC suite à la détection d'un antigène d'origine bactérien ou viral intracellulaire. Les LTh1 sont caractérisés par le facteur de transcription Tbet et vont produire de l'IFN γ et du TNF β stimulant les macrophages, les cellules NK et les LTc (Szabo et al., 2000; Zhu et al., 2010). Le but est de détruire les cellules infectées par le pathogène intracellulaire. De ce fait, on dit que les Th1 sont spécialisés dans la réponse contre les pathogènes intracellulaires.

Le profil Th2 est caractérisé par l'expression du facteur de transcription GATA-3. Après avoir capté un antigène provenant d'un pathogène extracellulaire, les DC sécrètent de l'IL4 et de l'IL-10, ce qui aboutit à la polarisation des LT CD4+ en LTh2 (Kaiko et al., 2008). Les Th2 vont à leur tour produire de l'IL-4 qui a pour effet de stimuler la production d'IgE par les plasmocytes et de stimuler les éosinophiles. Cela aura pour conséquence de neutraliser les parasites et bactéries extracellulaires (Zhu et al., 2010). Cette réponse Th2 peut dans certains cas provoquer des allergies. Lorsqu'elle devient excessive, les IgE produites en grande quantité vont se fixer sur les récepteurs des basophiles et mastocytes ce qui induit une libération importante d'histamine et donc la réaction allergique.

Les LTh17 résultent de la sécrétion d'IL-6, d'IL-21 et de TGF β par les DC (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). Ils expriment le facteur de transcription ROR γ t et sécrètent principalement l'IL-17 mais aussi l'IL-21 et 22. Ils jouent un rôle important notamment au niveau des muqueuses contre les bactéries extracellulaires et les champignons. Pour cela, ils stimulent l'activation des neutrophiles. Le profil Th17 est aussi impliqué dans l'apparition de certaines maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque, la maladie de Crohn ou la

polyarthrite rhumatoïde (Abraham and Cho, 2009; Cua et al., 2003; Littman and Rudensky, 2010).

Les DC vont également permettre le maintien de la tolérance et ainsi de diminuer l'activation du système immunitaire lorsque c'est nécessaire. Cette fonction des DC est détaillée dans la section suivante. Un des moyens d'avoir une action tolérogène est de polariser les LT CD4+ en LT régulateurs (Schmidt et al., 2012). Pour cela, les DC sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF β qui aboutissent à la polarisation des Treg. Ces derniers expriment fortement le facteur de transcription FoxP3 et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-4 et le TGF β (Josefowicz et al., 2012). Ces cytokines agissent sur les autres cellules immunitaires et ont un pouvoir inhibiteur. De cette manière, les Treg vont éviter un emballement de la réponse immunitaire et limiter les réponses allergiques ou auto-immunes.

Les cDC et pDC sont toutes deux capables de polariser les LT CD4+. Au sein des cDC, il a été montré que les cDC CD8 α + dirigent plutôt la réponse vers une réponse Th1 alors que les cDC CD8 α - orientent vers une réponse Th2 (Maldonado-López et al., 2001, 1999). Les pDC sont quant à elles importantes dans la réponse antivirale à travers la production d'IFN- α/β . Elles sont également capables de polariser les LT CD4+ naïfs en Th1, Th2, Th17 et Treg (Bonney et al., 2011).

3.3.3. Rôle des cellules dendritiques dans le maintien de la tolérance périphérique

La tolérance est un processus actif permettant le maintien de l'homéostasie du système immunitaire et évitant ainsi des activations trop importantes qui pourraient avoir des effets délétères sur l'organisme. Les mécanismes de tolérance interviennent au niveau central, dans les organes lymphoïdes primaires, et consistent principalement en l'éducation des LT à ne pas réagir contre des molécules du soi, évitant ainsi l'apparition de cellules auto-réactives et donc le développement de maladies auto-immunes. Les LT vont, par exemple, subir des processus de sélection drastiques qui vont permettre la production de cellules fonctionnelles (capables de réagir contre un pathogène) mais également inoffensives pour l'organisme (incapables de réagir contre le soi). Malgré tout, certaines cellules auto-réactives peuvent se retrouver en

périphérie. L'organisme possède donc des mécanismes de sécurité supplémentaires appartenant à la tolérance dite « périphérique ».

Les DC interviennent dans ces mécanismes de tolérance périphérique en induisant la non-réponse des LT (anergie), en limitant la production et la réponse des LT effecteurs, en induisant leur apoptose et en permettant la production de Treg (Manicassamy and Pulendran, 2011). Cette induction de tolérance peut se faire à travers la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-27 et le TGF- β et l'expression de l'indoleamine2,3-dioxygénase (IDO).

La capacité de régulation des DC semble dépendre de leur état de maturation et d'activation (Liu and Cao, 2015). Cette fonction serait notamment placée sous le contrôle de facteurs de transcription importants comme STAT3 (Melillo et al., 2010) et de modifications épigénétiques (Liu and Cao, 2015). Diverses études ont montré qu'il est possible d'induire la fonction régulatrice des DC grâce à des manipulations génétiques, des stimuli pathogéniques ou par des signaux apportés par d'autres compartiments cellulaires, par des cellules apoptotiques ou par le microenvironnement tumoral (Steinman and Banchereau, 2007). Les DC possédant des fonctions régulatrices conservent leur capacité à présenter l'antigène aux LT CD4⁺ mais l'expression à leur surface des molécules de costimulation comme CD80, CD86 et CD40, et leur production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 est diminuée. A l'inverse, l'expression de molécules inhibitrices comme CTLA-4 (récepteur reconnaissant les mêmes ligands que CD80/86 mais induisant un signal inhibiteur), PDL1 (Programmed death-ligand 1) et CD95L (FasL) ainsi que la production de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β et l'IL-10 est augmentée.

Ainsi, les DC jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire et celui de l'organisme tout entier en maintenant l'équilibre entre facteurs immunogènes et facteurs tolérogènes.

II. Rôle des facteurs épigénétiques dans le système immunitaire

1. Généralités

Les modifications épigénétiques sont décrites comme étant des mécanismes essentiels à la régulation de l'expression génique d'une cellule sans modification de son information génétique. Ces modifications sont transmissibles au cours des divisions cellulaires (mitose et

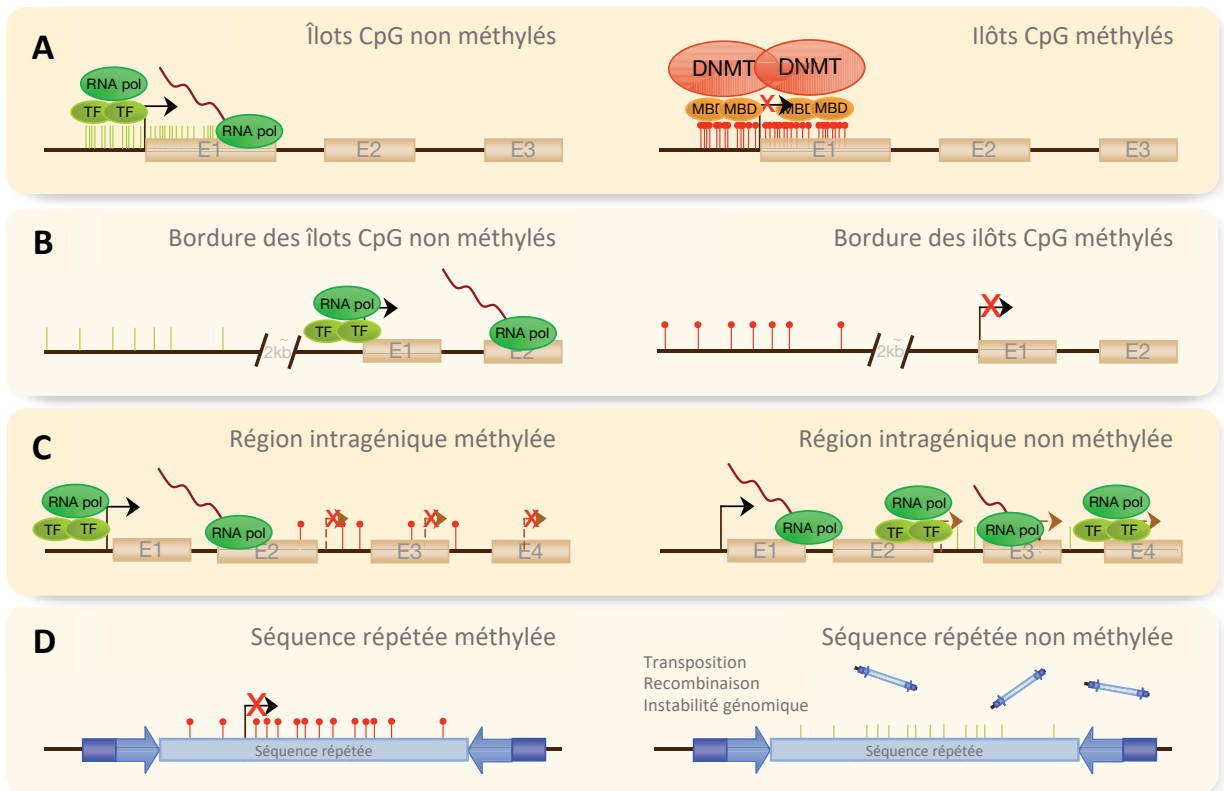


Figure 12 : Représentation des différents types de méthylation de l'ADN. **A.** La méthylation au niveau des îlots CpG situés sur les promoteurs des gènes entraîne une inactivation de la transcription. **B.** La méthylation au niveau des bordures des îlots CpG entraîne également une répression transcriptionnelle. **C.** L'absence de méthylation de certaines régions intragéniques peut provoquer des transcriptions anormales de gènes. **D.** La méthylation au niveau des séquences répétées stabilise la structure de l'ADN en empêchant l'apparition de recombinaison ou de transposition. *Modifié d'après Portela et al., 2010.*

méiose) mais, à l'inverse des mutations, elles sont réversibles. Les mécanismes épigénétiques sont nécessaires lors du développement, de la différenciation cellulaire et tout au long de la vie d'une cellule en lui permettant d'adapter son transcriptome en fonction des signaux environnementaux qu'elle reçoit (Samantara et al., 2021). Ainsi, un changement environnemental normal ou pathologique (stress, maladies) va conduire à une modification du profil d'expression génique, pouvant aboutir dans les cas pathologiques à une altération de la fonction cellulaire (Portela and Esteller, 2010).

Il existe trois types de modifications épigénétiques : les méthylations de l'ADN, les modifications des histones et les ARN non codants. Il est important de noter que toutes ces modifications ne sont pas exclusives les unes des autres et fonctionnent de concert pour réguler l'expression des gènes (Samantara et al., 2021).

1.1. La méthylation de l'ADN

L'une des premières marques épigénétiques à avoir été découverte est la liaison covalente d'un groupement méthyl au niveau des cytosines de l'ADN. Cette méthylation a tout d'abord été découverte au niveau des zones riches en GC nommées îlots CpG (Bird, 1986). Des études plus récentes ont montré que les cytosines n'appartenant pas aux îlots CpG peuvent également être méthylées (Lister et al., 2009) (**Figure 12**).

La méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG situés au niveau des sites d'initiation de la transcription est associée à une répression de la transcription tout comme la méthylation de zones en amont des îlots CpG. Cette répression participe notamment à restreindre l'expression de certains gènes spécifiques de tissus, lors du développement et de la différenciation des cellules le composant (Straussman et al., 2009). La méthylation de l'ADN joue également un rôle dans l'expression des gènes de manière monoallélique. Ce mécanisme est possible par l'hyperméthylation d'un des deux allèles parentaux permettant l'inactivation de ce dernier (Kacem and Feil, 2009).

Les mécanismes par lesquels cette méthylation réprime la transcription sont de deux types. Il a été montré que la méthylation des cytosines au niveau des promoteurs de certains gènes empêche la reconnaissance du promoteur par des activateurs de la transcription (Aoyama et al., 2004). De plus, certaines protéines possédant des domaines MDB (methyl-CpG-binding domain) sont recrutées par ces méthylations et recrutent à leur tour des complexes de

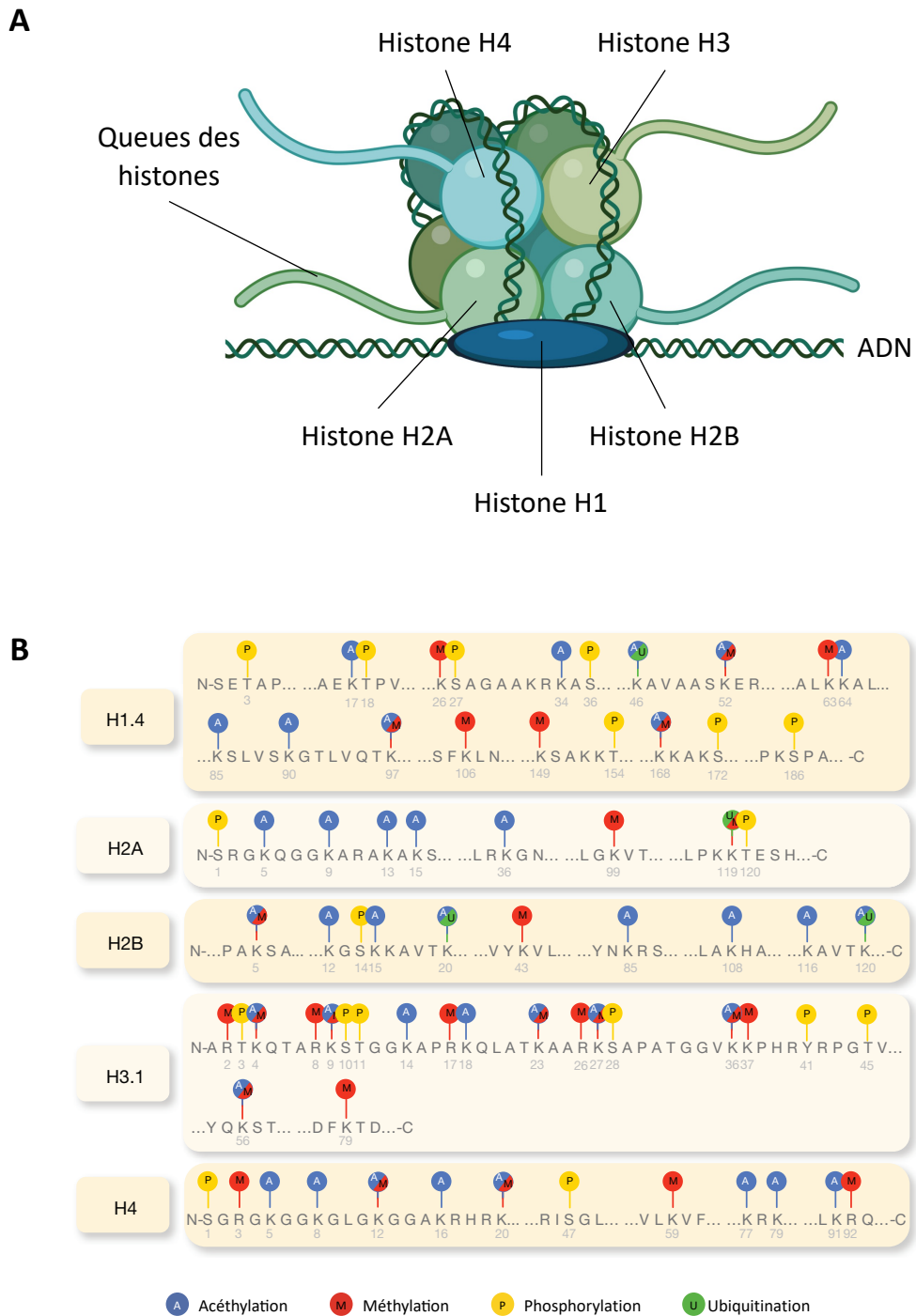


Figure 13 : Modification post-traductionnelle des histones. A. Structure d'un nucléosome, octamère d'histones composé de 2 dimères H2A-H2B et 2 dimères H3-H4. La structure du nucléosome est stabilisée par l'histone H1. **B.** Représentation schématique des diverses modifications post-traductionnelles pouvant être réalisées sur les acides aminés des histones. *Modifié d'après Portela et al., 2010.*

remodelage de la chromatine réprimant la transcription (Lopez-Serra and Esteller, 2008; Wade et al., 1999).

De manière moins fréquente, la méthylation de l'ADN est aussi associée à des zones de transcription actives lorsque celle-ci est présente dans les régions intragéniques. Dans ce cas, il a été montré qu'elle permet de limiter les erreurs de transcription (Zilberman et al., 2007).

Enfin, l'hyperméthylation des zones répétées permet de limiter la survenue de translocations et de recombinaisons (Esteller, 2007). Ainsi la méthylation de l'ADN est aussi responsable de la protection du génome et du maintien de son intégrité.

La méthylation de l'ADN est réalisée par une famille d'enzymes nommées DNMT (DNA méthyltransférases) (Portela and Esteller, 2010). Chez les mammifères, cette famille comprend cinq membres : DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L. Seuls DNMT1, DNMT3a et DNMT3b possèdent une activité méthyltransférase. Les DNA méthyltransférases DNMT3a et DNMT3b sont considérées comme des DNMT *de novo* et interviennent notamment dans la mise en place du profil de méthylation lors du développement embryonnaire (Esteller, 2007). Elles sont exprimées dans les cellules embryonnaires puis leur niveau d'expression décroît dans les cellules différenciées. DNMT1 est quant à elle une DNA méthyltransférase intervenant dans la maintenance de la méthylation lors des mécanismes de réplication de l'ADN.

1.2. La modification des histones

1.2.1. Structure

Dans les noyaux cellulaires, de nombreuses protéines interagissent avec l'ADN génomique. Cette structure ADN-protéines est appelée chromatine. Parmi toutes ces protéines, les histones vont réguler la compaction de l'ADN. Dans cette structure, 147 bp d'ADN sont enroulés autour d'un octamère d'histones pour former un nucléosome. Cet octamère est composé de deux dimères H3-H4 et deux dimères H2A-H2B (Bannister and Kouzarides, 2011). L'association de l'ADN avec les histones est stabilisée par l'histone linker H1. Les histones sont constituées d'une zone globulaire interagissant avec les histones formant le nucléosome et l'ADN ainsi qu'une partie N terminale libre appelée queue d'histone (**Figure 13A**).

1.2.2. Code histone et fonctions

Au niveau de cette queue principalement, mais aussi dans la zone globulaire, les histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que des méthylations, acétylations, phosphorylations et ubiquitinations (**Figure 13B**).

Certaines modifications vont coexister sur une même histone, tandis que d'autres non. Ainsi, la triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 27 (H3K27me3) est fréquemment associée à la triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 9 (H3K9me3) mais rarement avec la triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 4 (H3K4me3). La combinaison de ces modifications forme ce qu'on appelle le code histone qui va contribuer à plusieurs mécanismes cellulaires : le contrôle transcriptionnel, la réparation de l'ADN, la réplication, l'épissage alternatif et la condensation chromatinienne (Samantara et al., 2021). Parmi toutes ces fonctions, la contribution des modifications des histones à la régulation de la compaction de la chromatine est essentielle. En effet, la compaction de la chromatine va participer à réguler son accessibilité à différents facteurs protéiques (Sharma et al., 2010). De plus, la modification de l'accessibilité est essentielle pour réguler la transcription des gènes, une ouverture ou une fermeture de la chromatine mène respectivement à une activation ou une répression de la transcription (Campos and Reinberg, 2009; Fedorova and Zink, 2008). Dans le code histone, plusieurs modifications sont classiquement associées à l'activité transcriptionnelle. Par exemple, il a été montré que la triméthylation H3K4 permet une activation transcriptionnelle alors que la triméthylation de H3K27 est une marque de répression de la transcription (Lennartsson and Ekwall, 2009). De plus, une seule modification des histones ne suffit pas à activer ou réprimer la transcription. C'est souvent une combinaison de plusieurs modifications qui aboutit à la régulation transcriptionnelle. Il a également été montré que les acteurs épigénétiques sont capables d'interagir entre eux. C'est ce qui est appelé le « cross-talk ». Par exemple, il existe un lien entre la méthylation de l'ADN liée à DNMT3L et la modification de H3K4. DNMT3L interagit de manière spécifique avec la queue de l'histone H3 ce qui induit une méthylation *de novo* de l'ADN par le recrutement de DNMT3a. En revanche, cette interaction est inhibée en présence d'H3K27me3 (Ooi et al., 2007). Enfin, de nombreuses modifications des histones ont été associées à des processus de méthylation de l'ADN en recrutant des DNMT sur des cibles spécifiques. Ce mécanisme permet d'induire des modifications répressives des histones

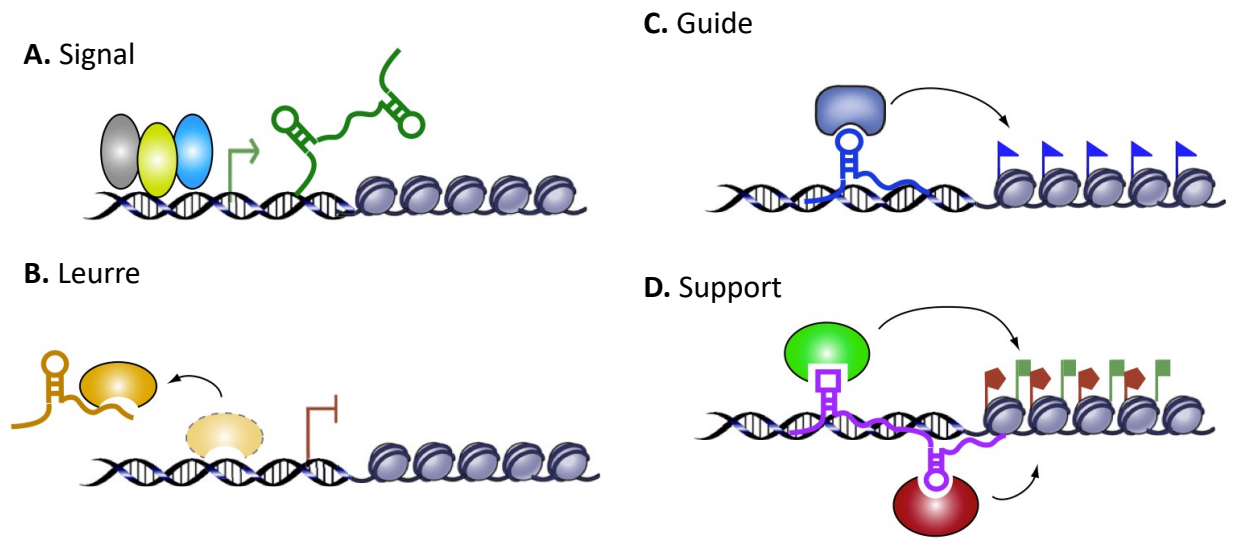


Figure 14 : Exemples de modes d'action des lncRNA. **A.** Les lncRNA peuvent promouvoir la transcription en reconnaissant des séquences cibles et permettant le recrutement de facteurs de transcription. **B.** Ils peuvent servir de leurre aux facteurs de transcription ou à certaines protéines interagissant avec l'ADN. De cette manière, les facteurs de transcription interagissent avec les lncRNA au détriment des séquences cibles sur l'ADN ce qui diminue l'activation transcriptionnelle. **C.** Les lncRNA peuvent servir de guide à certaines protéines et notamment aux complexes de modification des histones en les guidant sur des gènes cibles. Ils peuvent ainsi guider la compaction/décompaction de la chromatine à des endroits précis du génome. **D.** En temps que support, les lncRNA peuvent induire la production de complexes ribonucléoprotéiques (complexes de protéines associées à un lncRNA). Ces complexes peuvent alors agir sur la structure de la chromatine. *Modifié d'après Wang et al., 2011.*

sur des sites où l'ADN est méthylé ce qui amplifie la répression de la transcription (Tachibana et al., 2008).

1.2.3. Complexes enzymatiques

Il existe de nombreux complexes enzymatiques responsables de la modification post-traductionnelle des histones. Ces complexes sont composés d'enzymes qui ont des activités méthyltransférase, déméthylase, acétyltransférase, déacétylase, ATPase ou kinase. Ils possèdent également des protéines de structure ainsi que des protéines leur permettant de reconnaître et d'interagir avec les modifications des histones. Par exemple, la triméthylation d'H3K27 est assurée par le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). Ce complexe protéique est composé de 4 sous-unités : Suz12 (Suppressor of zeste-12) qui est une protéine à doigt de zinc permettant l'interaction avec l'ADN, EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) qui porte la fonction méthyltransférase, EED (Embryonic Ectoderm Development) qui permet d'interagir avec les tri-méthylations des histones telles que les tri-méthylations des lysines 9, 26 et/ou 27 de l'histone H3 et l'histone chaperone RbAp46/48 (Retinoblastoma protein Associated protein 46/48) (Margueron and Reinberg, 2011). A l'inverse, la déméthylation d'H3K27 est possible grâce aux déméthylases JMJD3 (Jumonji domain-containing protein D3) et UTX (Burchfield et al., 2015).

1.3. Les ARN non codants

Les ARN non codants sont issus des régions introniques ou intergéniques. Ils comprennent les longs ARN non codants (lncRNA) et les petits ARN non codants (sncRNA) (Statello et al., 2021). Ces ARN jouent un rôle important dans l'activation de l'expression de certaines régions géniques par la décompaction de la chromatine (Dueva et al., 2019). Il a par exemple été montré que les lncRNA jouent un rôle important dans l'inactivation du chromosome X au cours du développement embryonnaire. Ces ARN ont la capacité de recruter des machineries de remodelage comprenant des enzymes de modification des histones et induisant donc une modification de l'état de compaction de la chromatine (Yang et al., 2015). Il a ainsi été montré que certains lncRNA ont la capacité de recruter le complexe PRC2 et induisent ainsi une fermeture de la chromatine (Marín-Béjar et al., 2017). De plus, les lncRNA peuvent aussi recruter des protéines interférant avec les histones désacétylases ou empêchant l'initiation de la transcription (Mercer et al., 2009; Nagano and Fraser, 2009) (**Figure 14**).

Bien que les données sur les sncRNA soient plus récentes, plusieurs études montrent qu'ils jouent également un rôle important dans la régulation transcriptionnelle. En effet, des travaux ont montré que certains sncRNA peuvent réprimer l'expression de transposons dans les cellules germinales en favorisant la méthylation de l'ADN (Ohnishi et al., 2010). De plus, de même que pour les lncRNA, des sncRNA ayant pour cible des promoteurs de gènes peuvent inhiber la transcription en recrutant des histones désacétylases, des histones méthylases (H3K9 et H3K27) ainsi que des DNMT aboutissant à la compaction chromatinienne (Hawkins et al., 2009). D'autres études montrent que des sncRNA qui ont pour cible la TATA box présente sur les promoteurs de certains gènes peuvent directement bloquer l'initiation de la transcription sans qu'il y ait recrutement d'enzymes de modification de l'ADN ou des histones (Napoli et al., 2009).

En conclusion, ces études soulignent le rôle important des ARN non codants dans la modulation de l'expression génique, mais également dans l'interaction et la régulation des autres mécanismes épigénétiques.

2. Épigénétique et cellules dendritiques

Le rôle des modifications épigénétiques dans la différenciation de la lignée myéloïde, notamment dans la différenciation des sous-types de DC, est décrit dans la littérature (Álvarez-Errico et al., 2015; Ivashkiv and Park, 2016).

Concernant la méthylation de l'ADN, les analyses montrent l'existence d'une régulation précise du taux de méthylation de l'ADN à des sites spécifiques au cours de la différenciation, allant vers une réduction globale du taux d'ADN méthylé. En effet, l'analyse des méthylomes des différents progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes murins a montré une variation précise des niveaux de méthylation dans des régions cibles au cours de la différenciation, mettant en avant une importante plasticité épigénétique (Ji et al., 2010). Par ailleurs, cette étude a montré qu'un niveau de méthylation réduit favorise la lignée myéloïde aux dépens de la lignée lymphoïde, montrant ainsi l'importance de la régulation de la méthylation dans le développement de ces lignées (Ji et al., 2010). De la même manière, une étude menée sur des DC humaines a montré l'existence d'une déméthylation lors de la différenciation et de la maturation. Cette déméthylation a lieu sur des loci spécifiques impliqués dans la différenciation (monocyte vers DC immature) et dans la maturation (DC immature vers DC mature), tels que des gènes impliqués dans la reconnaissance de l'antigène. Ces données

suggèrent également une programmation épigénétique très précise au cours des phénomènes de différenciation et maturation (Zhang et al., 2014).

Concernant les modifications post-traductionnelles des histones, plusieurs études récentes ont impliqué ce phénomène (et les complexes enzymatiques associés) dans la régulation de la maturation des DC. Ainsi, la protéine HSP70L1 (heat shock protein 70-like protein) inhibe la maturation des DC humaines en réprimant le recrutement de Ash1l et en maintenant H3K27me3 et H2AK119Ub1 (ubiquitination de la lysine 119 sur l'histone H2A) sur les promoteurs du CMHII, des molécules de costimulation et de STAT3 (Yi et al., 2020). Ce phénomène induit l'inhibition de la transcription du CMHII, des molécules de costimulation et de STAT3 et diminue donc l'état de maturation des DC (Yi et al., 2020). Une autre étude a montré que la maturation des DC est régulée par le répresseur de transcription PCGF6 (Polycomb Group Factor 6). Ce dernier, en s'associant avec l'histone déméthylase JARID1c, diminue le niveau de triméthylation d'H3K4, indispensable à la maturation des DC (Boukhaled et al., 2016). Enfin, la régulation de la triméthylation d'H3K27 semble jouer un rôle important dans la maturation et l'activation des DC. Cette modification a été détectée au niveau des promoteurs des gènes codants les molécules de costimulation CD80 et CD86 dans des BMDC de souris infectées par le RSV (Respiratory Syncytial Virus) (Malinczak et al., 2020). De façon intéressante, l'inhibition spécifique des déméthylases JMJD3 et UTX avec l'inhibiteur GSK J4 induit une augmentation du taux d'H3K27me3 sur ces promoteurs, suggérant l'implication de ces déméthylases dans la régulation de la maturation des DC (Malinczak et al., 2020). Ces données, associées avec les travaux de Doñas et al., suggèrent que ces déméthylases contribueraient à la régulation de la réponse immunitaire induite par les DC, en régulant l'expression de cytokines (Doñas et al., 2016; Malinczak et al., 2020). En lien avec ces données, l'importance d'EZH2 lors de ce processus de maturation a également été mise en évidence récemment. En effet, l'inhibition spécifique d'EZH2 dans des DC issues de monocytes humains (moDC) induit une diminution de l'expression membranaire des molécules de costimulation et du CMHII. Cette modification phénotypique est accompagnée d'une diminution de la capacité des moDC activées à stimuler la prolifération des LT (Li et al., 2019). Sachant que JMJD3/UTX et EZH2 ont des actions opposées, ces résultats semblent donc contradictoires. Cependant, les données obtenues pour JMJD3/UTX l'ont été à partir de BMDC infectées, en

conséquence les résultats obtenus pour ces enzymes sont difficilement comparables avec ceux obtenus pour EZH2.

Globalement, les données existantes soulignent le rôle essentiel des modifications épigénétiques dans la régulation de la différenciation et de la maturation des DC.

3. Épigénétique et lymphocytes T

De nombreuses études ont montré l'importance des modifications épigénétiques lors du développement ou de la maturation des LT.

3.1. Pendant le développement

La modification la plus étudiée au cours du développement des LT est la méthylation de l'ADN (Correa et al., 2020). L'étude des méthylomes au cours de la lymphopoïèse a montré que le profil de méthylation est différent entre les différents stades de développement des LT suggérant que la méthylation de l'ADN est un processus dynamique et régulé pendant la lymphopoïèse T. Ces études montrent qu'il y a une augmentation du nombre des méthylations entre le stade CLP (progéniteur lymphoïde commun) et le stade DN1, suggérant un rôle important des méthylations *de novo* à ces stades de différenciation. De plus, le blocage des DNA méthyltransférases au niveau des progéniteurs multipotents, capables de se différencier à la fois en cellules de la lignée lymphoïde et myéloïde, entraîne une différenciation des cellules vers la lignée myéloïde au détriment de la lignée lymphoïde. Ainsi les méthylations de l'ADN sont importantes dans le choix précoce de la voie de différenciation (Bröske et al., 2009; Ji et al., 2010).

Plus tardivement, les méthylations de l'ADN permettent l'expression des gènes clefs de la maturation des thymocytes. Ainsi, il a été montré au niveau des stades DP, SP4 et SP8 qu'il y a un enrichissement des méthylations de l'ADN au niveau des régions intragéniques des gènes actifs spécifiques au thymus. De manière intéressante, ces méthylations sont associées à des modifications activatrices des histones telles que H3K27ac et H3K4me1. Ces modifications permettent la bonne expression des gènes intervenant dans la différenciation terminale des LT (Tsagaratou et al., 2014). Enfin, il a été montré que l'expression des corécepteurs CD4 et CD8 est régulée par les méthylations de l'ADN. Les LT CD8 matures présentent un locus CD4 hyperméthylé, ce qui participe à l'inactivation du locus CD4 (Sellars et al., 2015).

L'état de compaction de la chromatine, résultant des modifications des histones, est finement régulé au cours de la lymphopoïèse. Ce processus permet l'expression de gènes intervenants de manière ponctuelle et à des phases précises du développement des LT. Zhang et collaborateurs ont montré que l'expression des gènes est finement régulée entre les différents stades de développement des LT. Cette étude montre une corrélation entre l'expression des gènes et l'état de compaction de la chromatine, elle-même liée à la modification post-transcriptionnelle des histones. La majorité de ces modifications surviennent entre le stade DN1 et DP (Zhang et al., 2012). D'autres travaux ont porté sur l'accessibilité de la chromatine au cours des différents stades de développement des LT. Ils ont montré qu'il existe un remaniement de l'accessibilité chromatinienne tout au long de la lymphopoïèse et particulièrement entre le stade DN2 et DN3, moment où la recombinaison V(D)J de la chaîne β du TCR a lieu (Hu et al., 2018). Il a été montré qu'il existe des phases d'ouverture et de fermeture de la chromatine au cours des différents stades de développement des LT et que le facteur de transcription TCF-1 joue un rôle important dans la mise en place de ce processus (Johnson et al., 2018). De la même manière que pour les DC, la triméthylation d'H3K27 joue un rôle important au cours de la lymphopoïèse T. En effet, une étude récente a montré que l'expression d'EZH2 ainsi que le taux d'H3K27me3 varient au cours de la lymphopoïèse T soulignant l'importance de cette triméthylation au cours du développement des LT (Deshayes et al., 2022). De plus, la délétion d'EZH2 au niveau de la moelle osseuse entraîne une diminution drastique du nombre de lymphocytes produits (Jacobsen et al., 2017; Mochizuki-Kashio et al., 2011; Su et al., 2005). Jacobsen et collaborateurs ont montré que la perte d'EZH2 est associée à une diminution globale d'H3K27me3 au sein des progéniteurs thymiques et à une augmentation de l'inhibiteur du cycle cellulaire Cdkn2a, expliquant ainsi le défaut de lymphopoïèse T (Jacobsen et al., 2017).

3.2. Pendant l'activation

En ce qui concerne l'activation des LT, de nombreux mécanismes épigénétiques ont été décrits pour réguler cette étape cruciale. Par exemple, la polarisation des LT en profil Th2 est déclenchée par l'IL-4 qui induit l'activation de STAT6 et de GATA3. En retour, ces protéines contrôlent l'expression des cytokines spécifiques du profil Th2 (IL-4, IL-5, IL-13). Cette étape est caractérisée par une ouverture chromatinienne au niveau des régions promotrices correspondantes par le biais d'activation des enzymes de modification des histones. En même

temps, GATA3 et STAT6 recrutent la méthyltransférase EZH2 au niveau du promoteur de l'IFN γ , empêchant ainsi l'expression de cette cytokine caractéristique du profil Th1 (Wilson et al., 2009). De plus, les régulations épigénétiques sont souvent la somme de plusieurs modifications. Ainsi, cette polarisation vers un profil Th2 est accompagnée par des modifications de la méthylation de l'ADN. Des études ont montré que le locus codant l'IFN γ est hypométhylé dans des LT naïfs et que celui codant l'IL-4 est hyperméthylé. Lors d'une polarisation vers un profil Th1, ce profil de méthylation reste inchangé. Cependant, si la polarisation est orientée vers un profil Th2, le locus IFN γ devient hyperméthylé et le locus IL4 hypométhylé (Lee et al., 2002; Winders et al., 2004). D'autres études ont montré que les méthylations de l'ADN étaient importantes dans l'inactivation du locus FoxP3 dans les LT non Treg et que la déméthylation de ce locus ou la délétion de DNMT1 au sein des LT CD4+ FoxP3- est susceptible d'engendrer l'expression de FoxP3 suite à la stimulation du TCR de ces cellules. Ceci montre l'importance des méthylations de l'ADN et de DNMT1 dans la régulation de l'expression de FoxP3 (Josefowicz et al., 2012).

Ces quelques études présentées ci-dessus illustrent de la grande diversité des rôles des modifications épigénétiques dans la régulation de la lymphopoïèse T et de l'activation des LT. Ces études montrent que ces modifications sont des processus dynamiques tout au long de la maturation et de l'activation des LT. Ces données mettent donc en évidence l'importance des modifications épigénétiques au cours de la lymphopoïèse et l'activation des LT.

III. Le stress

1. Historique

De nombreux scientifiques ont contribué à définir le stress au cours du 19^{ème} siècle. Dans son livre « *On the Origin of Species* » paru en 1859, Charles Darwin a écrit que seuls les organismes capables de s'adapter à un changement environnemental peuvent survivre. Ainsi, ce que disait Darwin est que la survie est le résultat de l'interaction entre le monde biologique et un environnement stressant (Darwin, 1859). En 1865, le médecin français Claude Bernard introduit la notion d'équilibre du « milieu intérieur ». L'adaptation d'un organisme à un changement d'environnement est possible en maintenant le milieu intérieur stable et constant (Bernard, 1865). En 1932, Walter B. Cannon reprend les idées de Claude Bernard sur le milieu intérieur et présente le concept d'homéostasie comme un mécanisme basique de réponse au stress. Cannon est le premier à formuler des concepts de réponse au stress et de

possibles mécanismes moléculaires. Il introduit certains aspects psychologiques du stress en décrivant le principe de « fight or flight » (Cannon, 1934). Selon ce principe, une menace entraîne la décharge du système nerveux autonome qui amène l'animal à combattre ou à fuir. Il prouve que les substances responsables de ce comportement sont l'adrénaline, sécrétée par le système nerveux, ainsi que la noradrénaline (qu'il nomme sympathine), sécrétée par les glandes surrénales. La sécrétion de ces hormones est augmentée lorsqu'un animal se retrouve face à une situation stressante. Les travaux de Cannon ont été complétés en 1936 par les travaux de Hans Selye qui définit le stress comme une réponse physiologique non spécifique à tout besoin ou menace que rencontre l'organisme (Selye, 1974). Selye décrit pour la première fois le syndrome général d'adaptation.

2. Définition

Les travaux réalisés au cours des 19^{ème} et 20^{ème} siècles ont permis de définir le stress comme un déséquilibre homéostatique induit par un élément stressant interne ou externe à l'organisme. Ainsi, comme l'a décrit Selye, un stress peut être bénéfique puisqu'il permet la survie de l'organisme, mais selon le type de stress il peut aussi être délétère.

On distingue deux types de stress : les stress aigus et les stress chroniques. La différence entre ces deux types de stress est basée sur leur durée, leur intensité et leur répétabilité. Le stress aigu est souvent caractérisé par une intensité élevée et peut durer quelques minutes voire quelques heures. Le stress chronique peut avoir une intensité plus faible mais durer plusieurs heures, jours, mois ou années. Ce dernier peut aussi avoir une durée courte, mais dans ce cas il est répété dans un intervalle de temps court et sur une longue période. Il a été montré que le stress aigu a plutôt un effet positif (Dhabhar et al., 1996; Dhabhar and McEwen, 1997). A l'inverse, le stress chronique a un effet négatif sur l'organisme et empêche son bon fonctionnement. Il favorise ainsi le développement de cancers, de maladies infectieuses avec la réactivation de virus latents comme le virus d'Epstein-Barr ou encore des défauts de cicatrisation (Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005; Godbout and Glaser, 2006).

Il existe une multitude de stress face auxquels un organisme est régulièrement confronté. Ces stress peuvent être classés dans deux grandes catégories. Les stress socio-environnementaux sont liés à la psychologie et aux émotions d'un individu. Il en existe une multitude parmi lesquels on retrouve ceux en lien avec des relations inter-individuelles, la vie professionnelle, l'état de santé de l'individu. Les autres types de stress sont des stress physico-chimiques qui

impactent de manière physique ou chimique l'organisme. Ils regroupent par exemple la pollution chimique ou auditive, les radiations ou les changements de température, de pression atmosphérique, de gravité.

L'organisme est donc très fréquemment soumis à divers éléments stressants pouvant avoir un effet bénéfique ou délétère. Il possède un mécanisme de réponse au stress apparu au cours de l'évolution et appelé syndrome général d'adaptation.

3. La réponse de l'organisme face au stress : le syndrome général d'adaptation

Le syndrome général d'adaptation est décrit pour la première fois par Hans Selye (Selye, 1974). Il explique que, suite à l'exposition d'un individu à différents éléments stressants, la réponse physiologique qui en découle est toujours la même et peut être subdivisée en trois stades :

- La phase d'alarme, caractérisée par une réponse rapide et courte de type « fight or flight » décrit par Cannon. L'organisme mobilise ses ressources énergétiques pour répondre au mieux face au stress.
- La phase de résistance est ensuite mise en place dans le cas d'un stress plus long. L'organisme puise alors dans ses réserves énergétiques afin de rétablir l'homéostasie perturbée par l'élément stressant.
- La phase d'épuisement qui survient si l'homéostasie n'est pas rétablie, notamment si le stress est trop long, répété ou d'intensité trop élevée. Cette phase est déclenchée par un épuisement des ressources énergétiques entraînant des effets délétères sur les différents organes et donc les différentes fonctions physiologiques.

3.1. Phase d'alarme : activation du système sympathique

La détection d'un stress par l'organisme dépend du type de stress auquel il est soumis. Les stress physico-chimiques sont détectés par des récepteurs périphériques tels que des mécanorécepteurs ou des chimiorécepteurs. Ces récepteurs vont émettre des signaux somatosensoriels acheminés jusqu'au système nerveux centrale *via* des fibres nerveuses sensibles. Les stress socio-environnementaux sont quant à eux détectés par les organes sensoriels (Godoy et al., 2018). Ces organes transmettent les informations au système nerveux central par les innervations afférentes.

Au niveau cérébral, cette information est traitée au niveau du système limbique composé de l'hippocampe, de l'amygdale et des zones préfrontales (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Ce réseau de neurones est capable de comparer l'information reçue par les organes sensoriels avec les souvenirs et les expériences de l'individu. Lorsque le système limbique détermine que le stimulus est un évènement stressant, il active l'hypothalamus qui déclenche la réponse au stress. Pour cela, l'hypothalamus active l'ensemble du système nerveux sympathique, notamment en utilisant des médiateurs chimiques tels que l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Ces médiateurs ont pour conséquence l'activation des fonctions nécessaires au processus de « combat-fuite ». On observe donc une augmentation du rythme cardiaque, une vasoconstriction, une décontraction des voies aériennes, une dilatation de la pupille ou encore une mobilisation des réserves énergétiques. De la même manière, les fonctions non indispensables au processus de « combat-fuite » sont inhibées (e.g. digestion). Ce processus constitue la première phase de réaction face à un stress.

3.2. Phase de résistance et d'épuisement : activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS)

Lorsque le système sympathique ne suffit pas à rétablir l'homéostasie d'un organisme stressé, un mécanisme hormonal se met en place : c'est l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS). L'activation de l'axe HHS constitue la phase de résistance. Lors de cette phase, l'organisme puise dans ses réserves énergétiques afin de retrouver son homéostasie. Lors d'un stress aigu, il y a retour à l'homéostasie grâce à une réponse comportementale. A l'inverse, si le stress est trop intense, trop long ou répété, comme lors d'un stress chronique, cette phase de résistance ne suffit pas au retour à l'homéostasie et l'organisme épuise ses réserves énergétiques : c'est la phase d'épuisement. Au cours de cette phase, l'axe HHS est suractivé engendrant des modifications hormonales importantes qui peuvent avoir des effets délétères sur plusieurs fonctions physiologiques.

3.2.1. Mode d'action de l'axe HHS

Le déclenchement de l'axe HHS est la conséquence de l'activation de l'hypothalamus par le système limbique. En plus d'activer le système sympathique, l'hypothalamus produit de la CRH (corticotropin-releasing hormone) qui en se fixant au niveau des récepteurs spécifiques de l'hypophyse, entraîne la libération d'ACTH (adrenocorticotropin hormone) dans la circulation sanguine. Cette dernière est un messenger capable d'agir en périphérie sur la partie externe

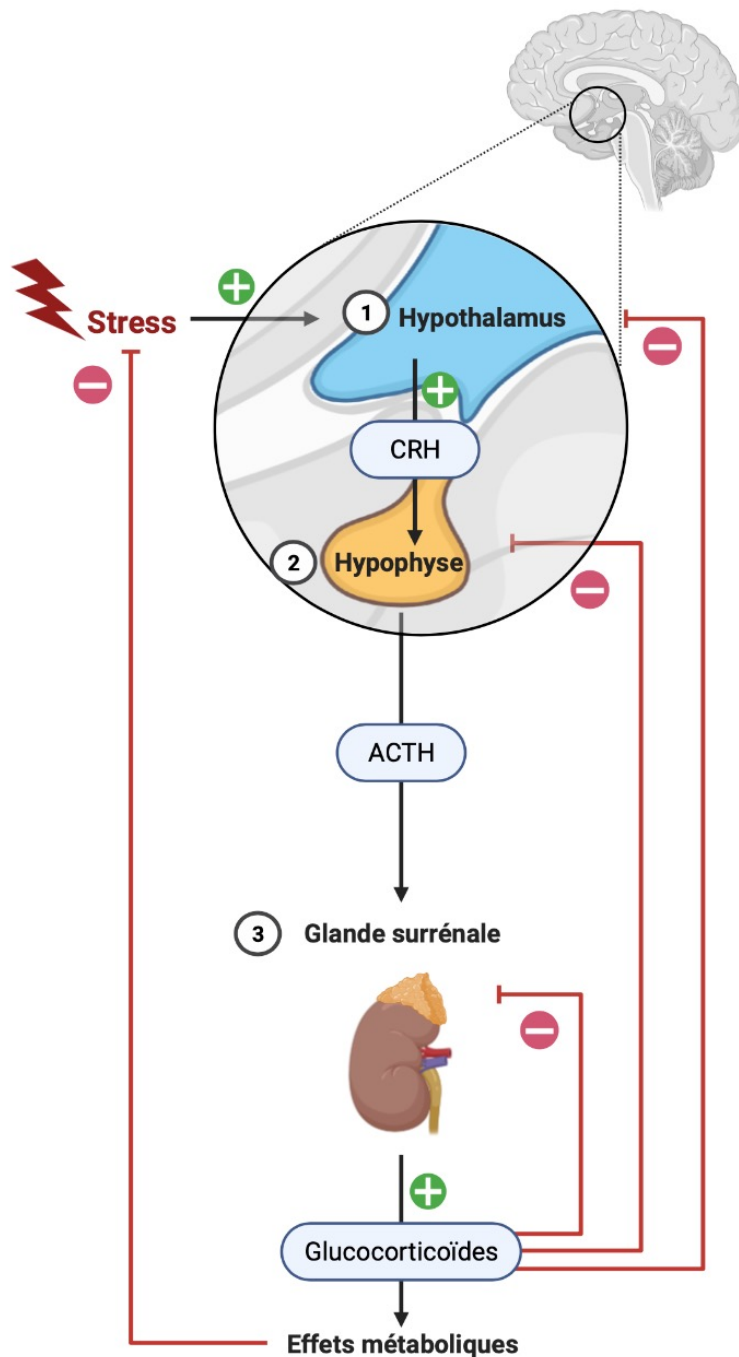


Figure 15 : Mode d'action de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) et sa régulation. La perception d'un stress par le système nerveux central active l'hypothalamus qui sécrète la CRH (corticotropin releasing hormone). Cette hormone entraîne la libération d'ACTH (adrenocorticotropin hormone) par l'hypophyse qui agit sur les glandes surrénales et provoque la libération de glucocorticoïdes. Ces derniers vont d'une part avoir des effets métaboliques permettant de répondre au stress, et d'autre part participer au rétrocontrôle en modulant l'axe HHS au niveau de l'hypothalamus, l'hypophyse ou les glandes surrénales.

des glandes surrénales appelées corticosurrénales. La fixation de l'ACTH au niveau de ses récepteurs spécifiques entraîne la production et la libération par les glandes corticosurrénales de glucocorticoïdes (GC) dans la circulation sanguine (cortisol chez l'Homme, corticostérone chez le rongeur) (**Figure 15**) (Smith and Vale, 2006; Stephens and Wand, 2012).

Les GC sont les hormones médiatrices du stress et vont agir sur de nombreux organes possédant leurs récepteurs. Il existe deux types de récepteurs : les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) (de Kloet et al., 2005). Ces deux types de récepteurs diffèrent par leur localisation et leur affinité pour les GC. Ainsi, les MR sont principalement situés au niveau du système limbique et l'hypothalamus alors que les GR sont retrouvés au niveau du SNC mais également au niveau des organes périphériques (Patel et al., 2000; Seckl et al., 1991). Il a été montré que les MR ont une affinité dix fois supérieure aux GR (Reul and Kloet, 1985). Cette différence permet aux GR de n'être activés qu'en cas de sécrétion massive de GC.

Les GR et MR sont des récepteurs nucléaires. Du fait de leur nature chimique, les GC peuvent traverser les bicouches lipidiques. Leur liaison aux récepteurs intracytoplasmiques entraîne la translocation du récepteur au noyau qui fonctionne alors comme un facteur de transcription. Il a alors pour cible diverses régions de l'ADN tel que les GRE (glucocorticoïd-response elements) situés au niveau des promoteurs des gènes impliqués dans diverses fonctions régulées par le stress telles que la réponse immunitaire, la cognition ou encore le métabolisme (e.g. catabolisme des lipides et des protéines, augmentation de la production de glucose) (Grbesa and Hakim, 2017; Weikum et al., 2017). Cette action des GC sur l'expression génique a pour but d'adapter l'organisme au stress auquel il est soumis et aboutit dans la plupart des cas à un retour rapide à l'homéostasie.

3.2.2. Régulation de l'axe HHS

Une production excessive et trop prolongée de GC a un effet néfaste sur l'organisme. Pour limiter cet effet néfaste, l'organisme possède des mécanismes de régulation de l'axe HHS.

Le premier mécanisme de régulation est l'existence d'un rétrocontrôle négatif de l'axe HHS. Grâce aux GR, les GC peuvent être détectées au niveau de l'hypothalamus, de l'hypophyse ou des glandes surrénales. Au niveau de l'hypothalamus, les GC inhibent la libération de CRH. Au niveau de l'hypophyse, elles inhibent la libération d'ACTH. Finalement, au niveau des glandes

surrénales, elles inhibent leur propre libération. Cette fonction inhibitrice des GC permet la diminution de leur sécrétion (**Figure 15**) (Sheng et al., 2021; Smith and Vale, 2006).

Un deuxième mode de régulation de l'axe HHS est la balance entre deux enzymes : les 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénases de type 1 et de type 2 (11 β -HSD1 et 11 β -HSD2). La première catalyse la réaction de réduction de la forme inactive des GC en forme active, c'est-à-dire la réduction de la 11-déhydrocorticostérone chez le rongeur (cortisone chez l'Homme) en corticostérone (cortisol chez l'Homme). La seconde catalyse la réaction inverse. La présence de ces enzymes au sein de nombreux organes et la balance entre production de forme active et inactive des GC permet de réguler localement le niveau de GC (Chapman et al., 2013). Ainsi, l'axe HHS est finement régulé afin de limiter l'impact négatif des GR lorsque l'organisme y est exposé à forte dose, de manière répétée et/ou sur une longue durée.

3.2.3. Dérégulation de l'axe HHS

Bien qu'il existe des mécanismes de régulation, certains types de stress comme les stress chroniques peuvent déréguler l'axe HHS et entraîner l'apparition de pathologies. Cette dérégulation est liée à une augmentation chronique du taux de GC, ce qui aboutit à l'épuisement des réserves énergétiques. Cette hypersécrétion de GC peut être accompagnée d'une désensibilisation des récepteurs aux GC, empêchant ainsi le rétrocontrôle négatif et amplifiant la phase d'épuisement. Cette suractivation de l'axe HHS est accompagnée de nombreuses pathologies telles que des troubles cardiaques (hypertension, AVC (accident vasculaire cérébral)), des ulcères, des dérégulations du sommeil et des troubles psychiatriques (Chu et al., 2022; Kadmiel and Cidlowski, 2013; Mizoguchi et al., 2003). D'autres pathologies sont les conséquences de modifications de l'activité du système immunitaire. En effet, de nombreuses études ont montré que le stress peut avoir un impact bénéfique ou délétère sur le système immunitaire et peut alors jouer sur l'état de santé de l'organisme.

4. Impact du stress sur le système immunitaire

Il est maintenant bien admis que le stress chronique a plutôt un effet délétère sur le système immunitaire, alors que le stress aigu à un effet stimulateur (Dhabhar and McEWEN, 2007). Il a été montré que le stress chronique a un effet suppresseur sur le système immunitaire et qu'il favorise ainsi l'apparition d'infections et de cancers. D'autres études ont montré qu'à l'inverse, ce stress est capable d'exacerber les allergies, les maladies auto-immunes et les

maladies inflammatoires. Ceci suggère que sous certaines conditions, le stress chronique stimule de manière aberrante le système immunitaire.

4.1. *Stress aigu*

Une des premières observations qui a été faite est que le stress aigu entraîne une redistribution des cellules immunitaires au niveau de la circulation sanguine et des tissus. En utilisant le modèle murin, des études ont montré que le stress aigu (2h) induit une diminution du nombre et du pourcentage de lymphocytes (diminution de 40 à 70% des LT, LB et NK) et de monocytes, ainsi qu'une augmentation du nombre et du pourcentage de neutrophiles présents dans la circulation sanguine (Dhabhar et al., 1995, 1994). Cette modification a été attribuée aux catécholamines sécrétées pendant ce stress. En effet, l'adrénalectomie des animaux empêche la redistribution des cellules immunitaires causée par le stress aigu. Chez l'Homme, il a été montré que les stress aigus, comme ceux perçus lors d'un examen ou lors d'une conférence en public, augmentent le nombre de leucocytes présents dans la circulation sanguine (Bosch et al., 2003; Brosschot et al., 1994; Mills et al., 1995; Naliboff et al., 1991). Il a été montré que ce stress entraîne une augmentation de la circulation des LT cytotoxiques, des monocytes et des NK. En ce qui concerne les LT helper, les LT reg et les LB, les résultats diffèrent d'une étude à l'autre en fonction du type de stress étudié. Ainsi, certaines études montrent une diminution de la circulation des LT helper, des LB et du ratio LTh/LTreg (Mills et al., 1995), alors que pour d'autres études il n'y a pas de modification de la circulation de ces cellules (Naliboff et al., 1991). L'ensemble de ces résultats montre que le stress aigu entraîne globalement une diminution de la circulation des leucocytes chez la souris et une augmentation chez l'Homme. Ces résultats à priori contradictoires peuvent être expliqués par le fait que (1) cette augmentation est observée suite à un stress de faible intensité entraînant majoritairement une activation du système nerveux sympathique, (2) l'augmentation globale du nombre de leucocytes peut être liée à une augmentation ponctuelle du nombre de NK et de granulocytes, (3) l'augmentation pharmacologique de glucocorticoïdes induit une diminution du nombre de lymphocytes et de monocytes sanguins. Des études ont montré que cette relocalisation des cellules immunitaires de la circulation sanguine vers la peau, les muqueuses et les ganglions lymphatiques est un moyen pour l'organisme de se préparer à une éventuelle attaque (Dhabhar et al., 1994; Dhabhar and McEwen, 1999).

La relocalisation des cellules immunitaires lors d'un stress aigu est accompagnée d'une augmentation de l'activation de la réponse immunitaire. Des travaux ont étudié la mise en place de l'immunité cutanée lors de l'exposition à un antigène à la suite d'une expérience stressante. Ces études ont montré qu'un stress aigu subit au moment de l'exposition à un antigène nouveau entraîne une amélioration significative de la réponse immunitaire cutanée qui s'ensuit. Par rapport aux témoins, les souris stressées pendant 2,5 heures avant immunisation ont montré une réponse immunitaire significativement améliorée lors d'une deuxième exposition à cet antigène. Ce résultat est expliqué par le fait que les souris stressées présentent une quantité plus importante de LT mémoires et effecteurs, produits au moment de la primovaccination, dans leurs ganglions lymphatiques. D'autres analyses ont montré que l'augmentation du nombre de LT mémoires induite par le stress peut avoir stimulé l'augmentation du nombre de lymphocytes et de macrophages infiltrants le site de réexposition à l'antigène. Cette infiltration accrue est liée à des niveaux plus importants d'IL-2, d'IFN γ et de TNF α produits sur le site de réexposition à l'antigène chez les animaux stressés au moment de la primovaccination (Dhabhar and Viswanathan, 2005). Les travaux de Viswanathan ont montré que cet effet immunostimulant du stress aigu est dû à une augmentation de l'expression de MCP-1 (macrophage chemoattractant protein 1), de MIP-3 α (macrophage inflammatory protein 3 α), de l'IL-1 α , de l'IL-1 β , de l'IL-6, du TNF α et de l'IFN γ . Ce stress aigu a également un effet positif sur la maturation des DC et leur migration vers les ganglions lymphatiques, sur l'activation des macrophages et des LT (Viswanathan et al., 2005). Ainsi, par l'activation du système nerveux sympathique, le stress aigu est capable d'augmenter l'efficacité d'un vaccin. Cet effet immunostimulant du stress aigu a été attribué aux hormones de stress. Il a été montré que l'ablation des glandes surrénales, qui aboutit à l'élimination de la production des glucocorticoïdes et d'adrénaline, abolit l'effet stimulant du stress aigu. En revanche, l'injection d'adrénaline ou de glucocorticoïdes à faible dose permet de restaurer cet effet (Dhabhar and McEwen, 1999). De plus, il a été montré que la noradrénaline a également un effet immuno-activateur dans le cadre d'un stress aigu notamment en stimulant la migration et la fonction des DC et des LT CD8 $^+$ (Saint-Mezard et al., 2003).

Ainsi, le stress aigu est un facteur pouvant influencer la localisation, l'état d'activation ou de maturation des cellules immunitaires. Il est, dans la plupart des cas, bénéfique et permet une meilleure réponse immunitaire. Dans certains cas cependant, il peut s'avérer néfaste. C'est

notamment le cas pour les personnes souffrant d'allergies, de maladies auto-immunes ou de maladies infectieuses. Dans ce cas, le stress aigu est un facteur aggravant la pathologie.

4.2. *Stress chronique*

Contrairement au stress aigu, le stress chronique a été montré comme supprimeur ou dérégulateur de la réponse immunitaire (Dhabhar and McEwen, 1997; Godbout and Glaser, 2006; Saul et al., 2005; Sklar and Anisman, 1981). L'équipe de Dhabhar a reproduit les expériences d'immunisation sur des souris stressées (Voir II.4.1.) qui ont montré que le stress aigu augmente l'efficacité du vaccin. Cette fois-ci, le stress a débuté trois semaines avant la première immunisation, ce qui correspond chez la souris à un stress chronique. Les résultats obtenus montrent que les souris stressées de manière chronique présentent une diminution de l'efficacité de l'immunisation. Cette étude montre aussi que la redistribution des cellules immunitaires est atténuée par le stress chronique et est corrélée à une atténuation de la réponse aux glucocorticoïdes. Cette étude montre ainsi un effet inhibiteur du stress chronique sur la réponse immunitaire (Dhabhar and McEwen, 1997). Il a également été montré le rôle aggravant du stress chronique sur la survenue de cancers de la peau. Pour cela, des souris soumises à un stress chronique ou non ont été exposées trois fois par jour et pendant 10 semaines aux UVB. Les souris stressées ont présenté un développement tumoral au niveau dorsal plus rapide que les souris contrôles. De plus, elles présentaient une diminution de l'expression au niveau de la peau de l'IFN γ ou encore de CD3 ϵ et CCL27/CTACK (chimiokines attirant les LT au niveau de la peau). Ces résultats ont été corrélés à la présence en moins grand nombre de LT dans l'environnement tumoral que chez les souris contrôles. Cette étude montre que le stress chronique augmente la susceptibilité aux cancers induits par les UV en supprimant l'immunité cutanée (Saul et al., 2005).

De manière générale, le stress chronique est susceptible d'impacter un grand nombre de cellules immunitaires. De nombreuses études ont révélé que le stress chronique est susceptible de diminuer l'activité des cellules NK impliquées dans l'élimination des cellules infectées ou des cellules tumorales. Ainsi, il a été montré chez la souris et chez l'Homme que l'augmentation des infections virales suite à un stress chronique peut être due à la diminution de l'activité des cellules NK (Bonneau et al., 1991; Glaser et al., 1986; Kiecolt-Glaser et al., 1986, 1984). Les lymphocytes sont également impactés par le stress chronique. Il est connu que leur maturation, leur prolifération et leur activation sont diminuées en condition de stress

chronique (Bonneau et al., 1991; Glaser et al., 1985; Kiecolt-Glaser et al., 1986, 1984). Le stress est également capable de provoquer une déviation du profil Th1 vers un profil Th2. En effet, il a été observé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer que les LT CD4 et CD8 sécrètent de l'IL10, une cytokine anti-inflammatoire plutôt caractéristique d'un profil Th2 (Glaser et al., 2001).

Les DC sont également impactées par le stress chronique. En effet, on observe une diminution de la production d'IL-12 par les DC humaines favorisant ainsi la polarisation vers un profil Th2 au détriment du profil Th1 (Panina-Bordignon et al., 1997). Il a également été observé une baisse globale de la fonction des DC (cellules de Langherans murines). Celle-ci comprend une inhibition de la capacité d'apprêtement de l'antigène (Seiffert and Granstein, 2006), de présentation (Seiffert et al., 2002) et d'activation des LT. Cette baisse de la capacité à activer des LT est liée à la diminution par le stress chronique de l'expression des molécules de costimulation comme CD86 et du CMHII mais également à la diminution de la production de cytokines (Elenkov and Chrousos, 2006; Pan et al., 2001).

Les effets du stress chronique sur le système immunitaire sont essentiellement liés aux hormones de stress (GC et catécholamines). En effet, de nombreuses cellules du système immunitaire possèdent des récepteurs aux hormones de stress et peuvent capter les hormones circulantes comme les GC (Miller et al., 1998). De plus, les organes lymphoïdes sont directement innervés par le système nerveux sympathique ce qui provoque une régulation de la maturation, de la prolifération, et de l'activation des cellules immunitaires (e.g. LT, LB) par les catécholamines. La majorité des exemples d'altérations du système immunitaire par le stress chronique exposés ci-dessus sont expliqués comme étant la conséquence de la surexposition aux hormones de stress.

Une telle dérégulation du système immunitaire par le stress est connue pour augmenter la susceptibilité aux infections virales et bactériennes, augmenter le risque de cancer et a une incidence sur l'apparition de maladies auto-immunes, de diabète et de maladies cardiovasculaires (Dhabhar, 2014; Dunn, 2006; Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005; Padro and Sanders, 2014; Webster Marketon and Glaser, 2008). Certaines études comparent ce phénomène à l'altération du système immunitaire lors du vieillissement, suggérant qu'un stress chronique peut induire un vieillissement prématuré du système immunitaire appelé immunosénescence

(Bauer et al., 2009). Enfin, des observations similaires ont été faites chez les spationautes soumis à des stress physiques et psychosociaux lors de leurs missions.

IV. Vols spatiaux et impact sur le système immunitaire

1. Généralités

Le 12 avril 1961, Youri Gagarine fut le premier humain à être envoyé dans l'espace. Depuis, les vols spatiaux se sont enchaînés, d'abord en direction de la lune, bientôt en direction de Mars. Pendant ces 60 dernières années, les connaissances dans le domaine spatial ont fait un bond impressionnant. Cependant, les vols spatiaux sont peu nombreux et la réalisation d'études complètes peut s'étaler sur une durée très longue et demande l'utilisation de matériels parfois compliqués à envoyer dans l'espace. De ce fait, les études sur les effets des vols spatiaux ainsi que les mécanismes par lesquels ils impactent l'organisme restent aujourd'hui incomplètes.

L'espace est un environnement stressant qui a des effets délétères sur l'organisme. Aussi, suite aux vols spatiaux, les astronautes peuvent présenter un dysfonctionnement du système cardiovasculaire, une atrophie osseuse et musculaire, une diminution du nombre de globules rouges, un dysfonctionnement rénal, une augmentation du risque de cancers, une perte de l'équilibre, des désorientations, et des troubles du système immunitaire (Guéguinou et al., 2009; Hariom et al., 2021). Ces altérations physiologiques sont liées aux différents stress rencontrés par les astronautes lors des missions spatiales.

2. Stress rencontrés lors de vols spatiaux

Les missions spatiales sont associées à deux types de stress : les stress socio-environnementaux et les stress physiques. Parmi les stress socio-environnementaux on trouve la modification du cycle circadien et l'isolement social. Les stress physiques sont l'exposition à des températures extrêmes, aux rayonnements ionisants, aux bruits ambiants de la station spatiale, aux changements gravitaires.

2.1. Stress socio-environnementaux et missions spatiales

A bord des vaisseaux spatiaux et de la station spatiale internationale (ISS), les astronautes sont soumis à un confinement extrême associé à un isolement social. Ils sont dans un espace clos, le renouvellement de l'équipage est rare, et ils sont loin de leurs proches. A cela s'ajoute une privation sensorielle. Dans l'ISS, la stimulation des cinq sens est fortement diminuée. En effet,

du fait de l'impesanteur le toucher est altéré, le goût est lui aussi impacté et ce phénomène est amplifié par des repas souvent peu variés. L'ouïe est perturbée par une stimulation perpétuelle (Voir IV.2.2.), l'odorat et la vision sont peu stimulés par la monotonie des informations olfactives et visuelles perçues. Les astronautes sont également soumis à une modification de leur rythme circadien. En effet, l'ISS se déplaçant à très haute vitesse autour de la Terre (28 000 km/h), il y a une alternance entre des phases de jour et de nuit toutes les quarante-cinq minutes ce qui a pour conséquence de perturber le rythme jour/nuit (Dijk et al., 2001). L'ensemble de ces stress socio-environnementaux peut avoir des conséquences plus ou moins graves sur les astronautes. Bien qu'entraînés, ces derniers peuvent développer des sentiments de solitude, de l'anxiété, ou même une dépression (Cooper, 1996).

2.2. *Stress physiques et missions spatiales*

2.2.1. La température

Bien que dans l'ISS la température soit maintenue entre 21 et 23°C, des extrêmes beaucoup plus importants sont mesurés à l'extérieur de la station. Du côté ensoleillé de la Terre, la température sur l'ISS peut atteindre plus de 100°C. Quarante-cinq minutes plus tard, lors d'un passage dans l'ombre de la Terre, la température peut descendre jusqu'à -100°C (Newman, 2000). De plus, lors du retour sur terre, les forces de frottement à l'extérieur du vaisseau peuvent aboutir à une augmentation de température pouvant aller jusqu'à 2000°C. Bien que le vaisseau soit protégé par un bouclier thermique, la température au sein de l'habitacle augmente fortement. Ces températures extrêmes obligent les astronautes à porter un scaphandre doté de régulateurs thermiques au cours de leurs sorties dans l'espace ou pendant le décollage et l'atterrissage de leur vaisseau, les protégeant contre les variations de température.

2.2.2. Les rayonnements ionisants

Dans l'espace, les astronautes sont également soumis aux rayonnements ionisants. Sur Terre, la magnétosphère (champ magnétique terrestre) nous protège de ces rayonnements. Ils correspondent principalement aux rayons cosmiques galactiques (particules énergétiques provenant de l'extérieur de notre système solaire), aux particules piégées dans le champ magnétique terrestre et aux particules provenant d'éruptions solaires (Thirsk et al., 2009). Ces rayonnements sont des rayons gamma, X et UV. En moyenne, une personne sur Terre reçoit une dose de 0,005 Sievert (Sv) par an. Une radiographie thoracique entraîne l'exposition à un

rayonnement d'environ 0,02 μSv . Dans l'espace, l'éloignement avec la magnétosphère terrestre entraîne une exposition des astronautes à des doses de rayonnements de 0,3 Sv par an, soit 60 fois plus qu'une personne sur Terre. De nombreuses études ont montré que les rayonnements ionisants peuvent endommager les cellules (e.g. lymphocytes) notamment en ayant un impact sur l'ADN et ainsi provoquer des cancers (e.g. leucémies) (Moreno-Villanueva et al., 2017).

2.2.3. Le bruit

A bord de l'ISS, il existe des systèmes essentiels qui fonctionnent jour et nuit tels que les systèmes de circulation d'air, des pompes et des moteurs. L'ensemble de ces systèmes produit un niveau acoustique constant d'environ 60 dB. Ce bruit ambiant élevé a des effets négatifs sur la communication entre les membres d'équipage, sur la concentration des astronautes et de leur sommeil (Thirsk et al., 2009).

2.2.4. La gravité

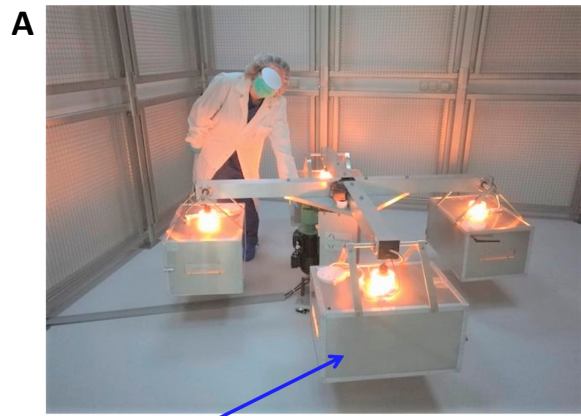
Enfin, lors des missions spatiales, les astronautes sont soumis à des modifications des forces gravitationnelles. Lors du décollage et de l'atterrissage, la force d'accélération entraîne une augmentation de la gravité qualifiée d'hypergravité et pouvant atteindre 7 xg . A l'inverse, à bord de l'ISS, les astronautes sont exposés à la microgravité. En effet, du fait que l'ISS soit située sur une orbite éloignée de la surface terrestre (donc éloignée de son centre de gravité) et qu'elle se déplace à une vitesse très élevée, elle est en chute libre continue et les astronautes à bord le sont aussi. C'est ce qui est appelé l'impesanteur, c'est-à-dire une absence de gravité ressentie (différent de l'apesanteur qui est une absence de gravité). Ainsi, en fonction de l'accélération de l'ISS, le niveau de gravité peut varier entre 0,01 et 0,000001 xg . Ces modifications gravitaires sont responsables de nombreuses altérations physiologiques et notamment des altérations du système immunitaire (Crucian et al., 2018).

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons exclusivement aux modifications gravitaires qui sont l'objet d'étude de mes recherches.

3. Les changements gravitaires

3.1. *Modèles d'études des changements gravitaires*

Que ce soit sur le plan technique ou financier, il est difficile de réaliser des expérimentations en conditions réelles de micro- ou d'hypergravité. De plus, les prélèvements provenant



Gondoles équipées avec un système d'éclairage et vidéo

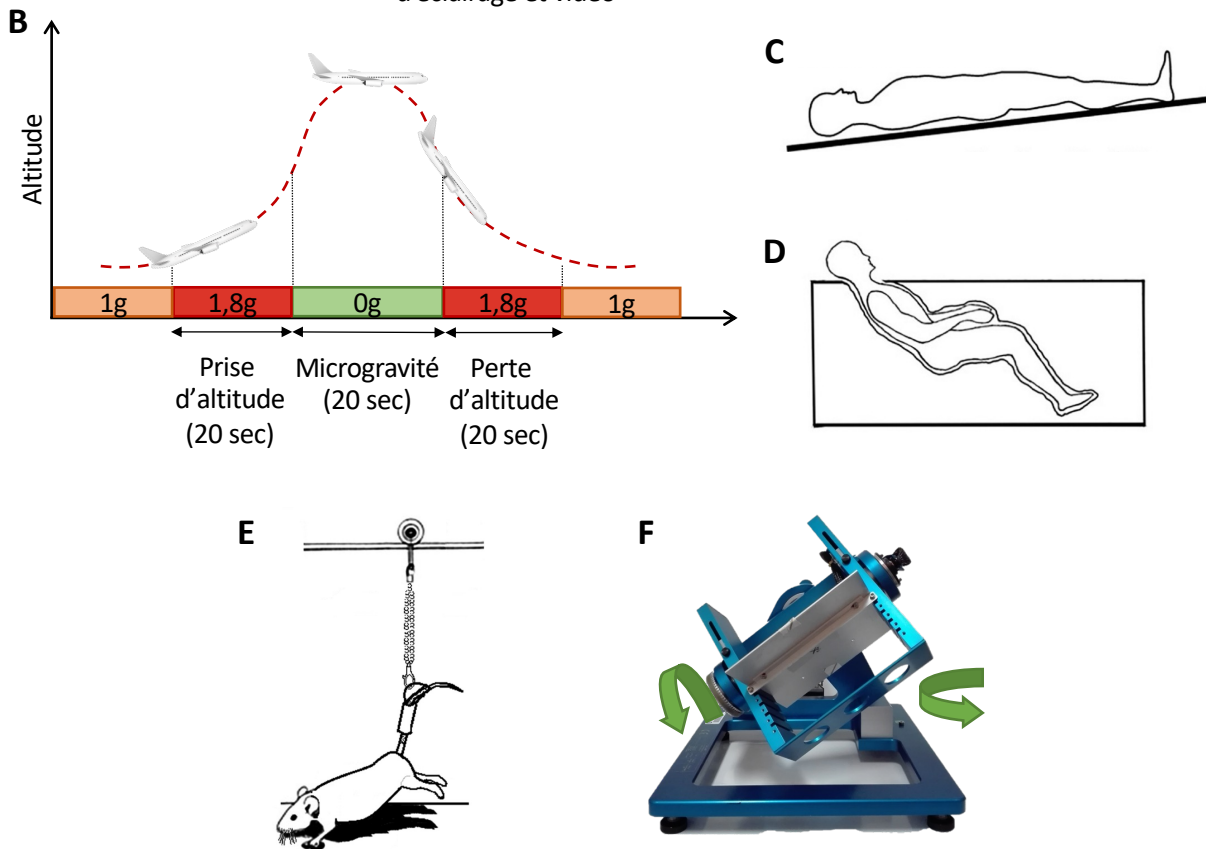


Figure 16 : Représentation des principaux modèles de modification gravitaire. **A.** Rotor pour rongeur permettant de créer une hypergravité de $4xg$. *Modifié d'après Bonnefoy et al., 2021.* **B.** Représentation de la trajectoire d'un avion pendant un vol parabolique permettant de simuler la microgravité. **C et D.** Modèles humains permettant de reproduire les effets de la microgravité. Lors d'un alitement prolongé (**C**) le sujet est allongé pendant une longue période avec un degré d'inclinaison de 6° afin de provoquer une redistribution des liquides vers la tête. Pendant une immersion sèche (**D**) la flottaison de l'organisme reproduit les effets observés en microgravité. *Modifié d'après Pandiarajan et al., 2020.* **E.** Modèle de Hindlimb Unloading (HU) simulant la microgravité chez le rongeur. Les rongeurs sont suspendus par la queue avec un angle d'environ 30° permettant une redistribution des fluides vers la tête. *Modifié d'après Ellman et al., 2013.* **F.** Modèle de Random Positioning Machine (RPM) simulant une microgravité de $10^{-3}xg$ applicable à un modèle cellulaire. Les cellules sont placées sur le plateau tournant dans les deux axes (flèches) avec des directions et un intervalle de temps aléatoire.

d'astronautes sont rares et précieux. De ce fait, de nombreux modèles terrestres, recréant certaines conditions de la vie dans l'espace, sont utilisés par les laboratoires de recherche.

3.1.1. L'hypergravité

Sur Terre, l'hypergravité peut être créée en utilisant des rotors (ou centrifugeuses). Ces systèmes tournent à des vitesses variables et permettent d'augmenter artificiellement la force de gravité. L'agence spatiale européenne (ESA) possède par exemple un rotor pouvant créer une force de gravité variant entre 1 xg (force à laquelle nous sommes soumis sur Terre) et 20 xg . Ces rotors permettent notamment d'étudier l'impact de l'hypergravité aiguë ou chronique sur les os, les muscles, le système immunitaire ou le système cardiovasculaire (**Figure 16A**).

Il existe des rotors adaptés aux modèles aquatiques comme le poisson-zèbre, le xénope ou le pleurodèle (Bonney et al., 2021). Ainsi, lors du développement du poisson-zèbre, l'exposition à une hypergravité de 3 xg pendant 4 jours entraîne une augmentation de la formation osseuse avec une modification de l'expression des gènes impliqués dans la formation de l'os, des muscles, du système nerveux, des glandes endocrines et du système cardiovasculaire (Aceto et al., 2015). De plus, il a été montré chez le pleurodèle que les LB sont impactées par l'hypergravité. En effet, une étude a montré que des pleurodèles exposés à 3 xg pendant 10 jours présentent une augmentation de l'expression des chaînes lourdes des immunoglobulines M (IgM) (Huin-Schohn et al., 2013). Ces résultats s'accompagnent d'une dérégulation de l'activation du facteur de transcription NF κ B suggérant un rôle important de ce facteur dans les altérations observées en hypergravité.

D'autres rotors sont adaptés pour les rongeurs comme la souris (Bonney et al., 2021). La durée d'exposition choisie pour une hypergravité chronique est d'environ 21 jours, ce qui correspond à 6 mois de vie humaine, durée moyenne des missions spatiales. Pour une hypergravité aiguë, le temps d'exposition peut varier mais n'excède pas quelques heures (e.g. 3 heures). Dans ce contexte, de nombreuses études ont montré les effets de l'hypergravité sur la structure des muscles, des os ou l'activation du système immunitaire. Ainsi, il a été montré qu'une exposition chronique (4 semaines) à 3 xg entraîne une modification du profil d'expression protéique, notamment des protéines intervenant dans la régulation musculaire (e.g. MyoD, Myf6, myogénine) (Kawao et al., 2016; Ohira et al., 2020). D'autres études utilisant ce modèle ont montré un effet sur la réponse immunitaire. Guéguinou et collaborateurs ont montré que la réponse immunitaire n'est pas la même lorsque des souris sont exposées à 2

xg ou 3 *xg* pendant 21 jours (Guéguinou et al., 2012). Seules les souris soumises à 2 *xg* présentent un défaut d'activation des lymphocytes spléniques suite à une stimulation au LPS. Une légère diminution de la production de chimiokines (MCP1, IP-10) et de cytokines de type Th1 (IFN γ , IL-12) a été observée chez les souris 2 *xg* alors qu'il y a une forte diminution de ces mêmes chimiokines et cytokines chez les souris 3 *xg*. Enfin, il a été noté que la concentration sérique en IgG et en IgA est modifiée chez les souris 2 *xg* alors que l'hypergravité de 3 *xg* n'a pas d'impact sur la concentration sérique en Ig. L'ensemble de ces résultats suggère une dérégulation de l'immunité par l'hypergravité dépendante du niveau de gravité.

Enfin, les rotors peuvent également être adaptés à l'Homme. Ces derniers permettent de réaliser des études directement sur l'Homme mais permettent surtout l'entraînement des astronautes avant leurs vols spatiaux.

3.1.2. La microgravité

a. Chez l'homme

Sur Terre, la microgravité est très difficile à recréer. Il existe cependant un modèle permettant de créer une véritable microgravité, c'est le vol parabolique (**Figure 16B**). Pour cela, l'avion utilisé réalise une succession de prises d'altitude suivies de pertes d'altitude. Entre ces deux phases durant chacune 20 secondes, il y a une phase de 20 secondes où l'avion est en microgravité. Ce modèle a pour avantage d'être facilement accessible et relativement peu cher comparé aux vols spatiaux. Les points négatifs majeurs de ce modèle sont le temps court de microgravité (20 secondes) ainsi que les phases d'hypergravité (1,8 *xg*), pendant lesquels l'avion prend ou perd de la hauteur, qui encadrent la phase de microgravité. Ces vols paraboliques sont fréquemment utilisés pour tester les appareils devant être utilisés pendant les vols spatiaux, pour étudier les effets de la microgravité sur le système vestibulaire (ou tout autre système réagissant très rapidement), et pour entraîner les astronautes (Friedl-Werner et al., 2021).

Les autres modèles sont des modèles qui recréent les effets de la microgravité notamment la diminution de l'utilisation des membres inférieurs et la redistribution des fluides vers la tête. Chez l'Homme, le modèle simulant les effets de la microgravité le plus utilisé est le modèle d'alitement prolongé ou « Bed Rest » (**Figure 16C**). Ce modèle est caractérisé par des alitements sur une période longue (60 à 90 jours) avec une inclinaison de 6°. Bien que les

sujets soient toujours soumis à la gravité terrestre, cette position permet de redistribuer les fluides corporels vers la tête comme lors des vols spatiaux. Ce modèle est principalement utilisé pour déterminer les effets sur les systèmes musculosquelettiques et cardiovasculaires. Il est également utilisé pour étudier l'impact sur le système immunitaire. Dans ce dernier cas, les résultats indiqueraient qu'un alitement prolongé n'entraînerait pas de changements immunitaires similaires à ceux observés chez les astronautes (Crucian et al., 2009). Par exemple, aucun changement n'a été constaté dans le nombre total de globules blancs ou le pourcentage de neutrophiles au cours de la période d'alitement. De plus, aucun changement significatif n'a été observé dans les sous-populations de lymphocytes (Bonney et al., 2022). Enfin, aucun changement dans les hormones de stress plasmatiques ou salivaires n'a été trouvé dans les études d'aliments prolongés. Or, il est bien connu que pendant les vols spatiaux, les astronautes présentent un niveau accru d'hormones de stress, particulièrement pendant le décollage et l'atterrissage, les deux étapes critiques de la mission (Crucian et al., 2013; Mehta et al., 2017; Pierson et al., 2005). Les hormones de stress étant en partie responsables des altérations des différentes fonctions immunitaires observées pendant les vols spatiaux, cette différence avec le « Bed Rest » explique probablement l'absence de dérégulations immunitaires avec ce modèle.

Bien que moins utilisés et donc non détaillés ici, il faut savoir qu'il existe d'autres modèles de microgravité comme l'immersion sèche (**Figure 16D**). Dans ce modèle, le sujet est posé sur un tissu imperméable sous lequel se trouve de l'eau. La flottaison de l'organisme reproduit les effets observés en microgravité.

b. Chez le rongeur

Le modèle HU (pour « Hindlimb Unloading ») ou modèle de suspension anti-orthostatique est le modèle le plus fréquemment utilisé pour simuler les effets de la microgravité chez le rongeur (Globus and Morey-Holton, 2016) (**Figure 16E**). Les souris ou rats sont suspendues par la queue avec un angle de suspension compris entre 25 et 30° de sorte que seuls les membres antérieurs touchent le fond de la cage. Cette suspension permet une redistribution des fluides corporels vers la tête et une hypokinésie des membres postérieurs comme en microgravité. De nombreuses similitudes ont été montrées entre les effets de ce modèle et les effets observés sur l'organisme durant les vols spatiaux (Globus and Morey-Holton, 2016). La principale limite de ce modèle est le fait que, bien que les membres postérieurs subissent

une hypokinésie, les membres antérieurs sont soumis à la gravité terrestre et leur fonction n'est pas diminuée. Cependant, les avantages de ce modèle sont sa facilité de mise en œuvre et le fait qu'il permette de réaliser des études multiparamétriques. C'est-à-dire d'associer un autre type de stress (radiations, infections) en plus de la simulation des effets de la microgravité.

Le modèle HU est un excellent modèle pour étudier les effets de la microgravité simulée sur diverses fonctions physiologiques telles que sur le système musculosquelettique, le système nerveux, le système cardiovasculaire, le système visuel, la réponse au stress ou encore le système immunitaire (Bloomfield et al., 2016; Chapes et al., 1993; Giangregorio and Blimkie, 2002; Momken et al., 2011; Pierre et al., 2016; Stein and Wade, 2005).

c. *In vitro*

Le développement de systèmes *in vitro* a fortement aidé à comprendre l'impact de la microgravité sur une cible cellulaire. Cependant, ces modèles ne permettent pas de prendre en compte les autres facteurs présents dans l'organisme et qui peuvent influencer la réponse d'une cellule donnée (e.g. système hormonale, communication entre systèmes).

Les tours de largage ou « drop tower » offrent les meilleurs niveaux de microgravité (10^{-6} xg). Elles fonctionnent sur le principe de la chute libre. Cependant, la microgravité qu'elles simulent est dépendante de la hauteur de la tour et celle-ci ne dure que quelques secondes. Par conséquent, elles sont plutôt utilisées pour des tests de matériels et peu utilisées en biologie.

Un autre modèle pouvant être utilisé en culture cellulaire est la fusée sonde. En effectuant un vol parabolique, la fusée sonde crée de la microgravité pendant quelques minutes. L'inconvénient de ce modèle est le temps court de microgravité qui s'accompagne d'une hypergravité au décollage et à l'atterrissage ce qui induit un biais dans l'étude des effets de la microgravité. Néanmoins, ce modèle a par exemple été utilisé pour étudier l'impact de la microgravité sur le développement du système nerveux chez l'amphibien (Duprat et al., 1998).

Il existe aussi un modèle permettant de lutter contre la force gravitationnelle en créant une force opposée (Herranz et al., 2013). La lévitation magnétique permet d'étudier l'impact de la microgravité sur une culture de cellules (e.g. cultures bactériennes) (Dijkstra et al., 2011) mais également sur des organismes entiers (e.g. drosophile) (Herranz et al., 2012). Cependant, ce

modèle est peu utilisé du fait de son principal inconvénient, l'utilisation d'un champ magnétique qui peut interférer avec certains composants cellulaires, rendant les conclusions de ces études difficiles.

Le modèle le plus utilisé est le clinostat. Ce dernier est un appareil rotatif permettant de constamment réorienter le vecteur gravitaire et ainsi de simuler la microgravité (Klaus, 2001). Il existe différents types de clinostats. Les clinostats possédant un axe de rotation tournant perpendiculairement au vecteur gravitationnel sont des clinostats 2D, ceux qui possèdent deux axes de rotation tournants perpendiculairement l'un à l'autre sont des clinostats 3D. Enfin, les clinostats 3D dont la vitesse et l'angle de rotation sont aléatoires sont des RPM (Random Positioning Machine) (Brungs et al., 2016; Crucian et al., 2014; Herranz et al., 2013) (**Figure 16F**). C'est ce modèle que nous avons décidé d'utiliser pour nos études. La RPM est considérée comme étant un bon modèle de microgravité (Wuest et al., 2015) et permet de simuler la microgravité pendant des temps choisis par l'expérimentateur. Elle permet de créer une microgravité de $10^{-3} xg$ en utilisant une vitesse angulaire moyenne de $60^\circ/\text{sec}$. Les inconvénients de la RPM sont la convection (mouvement du fluide) et les vibrations liées à la rotation des axes. Pour limiter cela, il est nécessaire de trouver un intervalle de variation de la vitesse angulaire le plus faible possible. De plus, le biais lié aux vibrations peut être éliminé en plaçant la culture contrôle sur le socle de la RPM.

Ainsi, les expériences réalisées au cours des vols spatiaux et celles réalisées grâce aux modèles de changements gravitaires ont permis d'amplifier les connaissances concernant les effets des modifications gravitaires sur les différents systèmes physiologiques et notamment les effets sur le système immunitaire.

3.2. Effets des modifications gravitaires sur le système immunitaire

3.2.1. Généralités

Il a été montré que la moitié des astronautes ayant séjourné six mois dans la station spatiale internationale sont sujets à des éruptions cutanées, des infections et des troubles respiratoires comme des rhinites (Crucian et al., 2016). De plus, des virus latents tels que les virus de l'herpès, de la varicelle ou le cytomégalovirus se réactivent chez la plupart des astronautes en mission (Mehta et al., 2017, 2014).

De nombreuses études ont montré que ces altérations du système immunitaire pouvaient s'expliquer par une moindre efficacité de l'immunité adaptative. En effet, il a par exemple été constaté chez des souris envoyées dans l'espace, une diminution de la taille des organes lymphoïdes (rate, thymus) liée à une diminution du nombre de lymphocytes (Baqai et al., 2009). Corrélée à cela, une augmentation de l'apoptose des cellules du système immunitaire en condition de microgravité a été montrée et notamment l'apoptose des LT (Lewis et al., 1998). L'immunité innée semble également touchée par les modifications gravitaires puisque des études ont montré que les vols spatiaux perturbent les fonctions, notamment la phagocytose, des neutrophiles et des monocytes (Fripiat et al., 2016).

Des travaux ont analysé l'impact des vols spatiaux sur le développement des cellules immunitaires. Des rongeurs ayant séjourné dans l'espace ou soumis à une suspension anti-orthostatique (modèle HU) présentent une diminution du nombre de progéniteurs des granulocytes et monocytes (Dunn et al., 1985; Ichiki et al., 1996; Sotnezova et al., 2017) suggérant que le stress gravitaire a un impact dès les toutes premières étapes de différenciation des cellules immunitaires. Cette observation a été confirmée par la culture en vol de progéniteurs hématopoïétiques humains qui a révélé un effet inhibiteur sur la production de globules rouges (Davis et al., 1996). La lymphopoïèse B est également altérée. En utilisant un modèle amphibien, une étude a montré que la transcription des chaînes lourdes des IgM est augmentée. Cette observation pourrait être expliquée par une diminution du facteur de transcription Ikaros, facteur déterminant de la lignée lymphoïde (Huin-Schohn et al., 2013). Une autre étude a révélé une diminution des progéniteurs lymphoïdes communs, des cellules pro-B, pré-B ainsi qu'une altération de la structure osseuse (Lescale et al., 2015). Des altérations de l'expression des protéines nécessaires au développement de l'os et du système immunitaire ont également été mises en évidence (Tascher et al., 2019). La lymphopoïèse T est également altérée par la microgravité. En effet, une diminution des lymphocytes T a été observée aux stades de maturation double positif et simple positif lorsque des thymus fœtaux murins sont cultivés en microgravité simulée (Woods et al., 2003). Une réduction significative de la lymphopoïèse T a également été observée chez des astronautes au retour d'un vol spatial (Benjamin et al., 2016). Le répertoire TCR murin est lui aussi impacté par les modifications gravitaires. L'exposition de souris gestantes à une hypergravité de 2 g

entraîne une perturbation de la signalisation des TCR et de la diversité des TCR produits chez les nouveaux nés (Ghislin et al., 2015).

De manière intéressante, en plus des altérations du système immunitaire, certaines bactéries ont une pathogénicité augmentée et peuvent devenir résistantes à certains antibiotiques durant les vols spatiaux (Altenburg et al., 2008). Ces constats amplifient les risques de développement de pathologies au cours des missions spatiales.

3.2.2. Effets sur les lymphocytes T

Du fait de leur rôle important dans l'immunité adaptative, notamment en tuant les cellules infectées et tumorales ou en régulant la réponse immunitaire et en activant les autres cellules immunitaires, les perturbations de l'activation des LT peuvent avoir des conséquences dramatiques pour l'organisme (e.g. cancers, infections, maladies auto-immunes). De ce fait, de nombreuses études ont porté sur l'impact des changements gravitaires rencontrés pendant les vols spatiaux sur les LT.

Il a été observé, à la suite de vols spatiaux, que les LT des astronautes présentent une diminution de leurs fonctions et de leur production cytokinique (Crucian et al., 2016). De plus, la microgravité engendre une diminution des interactions entre cellules, causant une diminution de la motilité des LT et déstructurant leur cytosquelette (Cogoli, 1981; Cogoli et al., 1993; Cogoli and Cogoli-Greuter, 1997; Hughes-Fulford, 2003; Lewis et al., 1998). Compte-tenu de l'importance des interactions cellulaires pour l'activation des LT et l'importance du cytosquelette dans la transduction du signal, cela pourrait en partie expliquer l'amointrissement de la réponse immunitaire lors des vols spatiaux. Plus récemment, des analyses ont montré que la lignée de LT humains Jurkat envoyés dans l'espace présente une expression modifiée des gènes intervenant dans le cytosquelette (Lewis et al., 2001). Globalement, il a été montré que l'activation de LT cultivés dans l'espace est perturbée *via* la diminution de l'induction de certains gènes précoces régulés principalement par les facteurs de transcription NF κ B, CREB (Cyclic adenosine monophosphate Response Element-Binding protein), AP-1 (Activator Protein 1) et STAT après la stimulation du TCR. Cela serait lié à la diminution de l'activation de la PKA (Protein Kinase A) responsable de l'amorçage des voies NF κ B, AP-1 et CREB en condition de normogravité (Boonyaratankornkit et al., 2005; Chang et al., 2012; Vogel et al., 2019). Ces données ont été confirmées en étudiant l'expression génique de LT sanguins d'astronautes présents dans l'ISS. Cette étude a révélé une diminution

de l'expression de 99 gènes. Ces gènes sont pour la majorité des facteurs de transcription intervenant dans la régulation des gènes du cytosquelette (Chang et al., 2012). En 2019, la NASA a réalisé une expérience sur des jumeaux uniovulaires. Un des jumeaux est resté sur Terre pendant que l'autre a passé 1 an dans l'ISS. Cette étude a permis d'observer les effets des conditions spatiales en s'affranchissant des différences génétiques entre individus. La comparaison de l'expression génique entre les deux jumeaux a montré que les vols spatiaux affectent l'expression des gènes. Les LT ont montré le plus grand nombre de gènes exprimés différemment, même après le retour sur Terre (Garrett-Bakelman et al., 2019).

La réponse des LT aux mitogènes est réduite après un vol spatial. De même, des LT humains stimulés *in vitro* avec le mitogène concanavaleine A (ConA) présentent une activation et une prolifération cellulaire considérablement réduites en microgravité (Ulrich-Lai and Herman, 2009), sur un vol de fusée-sonde (Pippia et al., 1998; Schwarzenberg et al., 1998) ainsi qu'en microgravité simulée (Luo et al., 2014). Ces études ont montré que ce défaut d'activation pourrait être lié à un défaut de transduction du signal après fixation de la ConA sur son récepteur. La fixation de la ConA sur son récepteur n'est pas impactée par la microgravité. Cependant, la transduction du signal requiert un remaniement du cytosquelette d'actine et ce dernier est significativement diminué en microgravité ce qui aboutit à la diminution de l'activation des LT (Cogoli and Cogoli-Greuter, 1997). De plus, les LT exposés à la microgravité et stimulés par la ConA présentent une diminution de l'expression des molécules d'activation CD25, CD69 et CD72 ainsi qu'une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN γ) (Luo et al., 2014). Enfin, l'exposition à la microgravité simulée pendant 24h est responsable de l'apoptose des lymphocytes humains (Maccarrone et al., 2003).

3.2.3. Effets sur les cellules dendritiques

Bien qu'elles soient au centre de la réponse immunitaire et permettent son orchestration, *via* la polarisation des LT CD4+, très peu d'études ont abordé l'impact des variations gravitaires sur les DC.

Il a été montré, chez l'Homme, que la différenciation des DC à partir de monocytes d'astronautes prélevés en fin de mission ou de cellules souches hématopoïétiques humaines exposées à la microgravité simulée est altérée (Low et al., 2018; Monici et al., 2007). De plus, Monici et collaborateurs ont montré que les DC dérivées de monocytes présents dans le sang d'astronautes après un vol spatial présentent une expression membranaire réduite des

marqueurs d'activation tels que le CMHII, CD80 et CD86, accompagnée d'une expression génique diminuée de ces marqueurs (Monici et al., 2007). L'expression du facteur de transcription NFκB (important pour l'activation/maturation des DC) est également diminuée dans ces cellules. Ces résultats suggèrent un défaut d'activation/maturation des DC à la suite d'un vol spatial (Monici et al., 2007). Leurs fonctions comme la phagocytose et la production de cytokines semblent également diminuées (Savary et al., 2001). Ceci pourrait expliquer la diminution de leur efficacité de réponse contre les pathogènes observée en microgravité simulée (Sastry et al., 2001). De plus, en microgravité simulée, il a été montré que les DC murines ont une mortalité accrue (Stepkowski et al., 2006). Une étude utilisant la lignée de DC JAWSII ou des BMDC (différenciées à partir de moelle osseuse grâce au GM-CSF) a montré une diminution de leur état d'activation lié à la diminution de l'expression des marqueurs d'activation (CMHII, CD80, CD86, CD40, IL6) lorsqu'elles sont cultivées en microgravité (clinostat 2D) pendant un temps long (>72h) alors qu'un temps court de microgravité (<72h) entraîne une augmentation de l'expression de ces mêmes marqueurs (Tackett et al., 2019). De plus, les DC exposées à un temps court de microgravité ont une capacité augmentée à activer les LT CD4 et CD8 contrairement aux DC soumises à la microgravité pendant un temps long (Tackett et al., 2019). Cette étude montre ainsi que, bien que la raison soit encore inconnue, la microgravité peut avoir des effets opposés sur les DC et que ces effets dépendent de la durée d'exposition.

3.2.4. Voies de signalisation et modifications gravitaires

L'altération des fonctions immunitaires peut s'expliquer par des dérégulations des voies de signalisation régissant diverses fonctions cellulaires (e.g activation, prolifération, réorganisation du cytosquelette et survie).

Comme nous venons de le voir, il a été montré que l'altération de l'activation des LT en conditions spatiales est liée à une dérégulation des facteurs de transcription NFκB, CREB, AP-1 et STAT après la stimulation du TCR (Boonyaratanakornkit et al., 2005). De plus, les voies des MAPK sont connues pour être sensibles au stress. La voie de p38 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) a été étudiée en réponse à un changement gravitaire (microgravité ou hypergravité). Il semble que la microgravité soit capable d'activer cette voie et d'engendrer des effets multiples. En effet, il a été montré que la microgravité entraîne une suractivation de cette voie dans des macrophages, augmentant ainsi leur production de cytokines pro-

inflammatoires comme l'IL-6 (Wang et al., 2015). Une étude récente a également montré que les vols spatiaux et la microgravité simulée dérèglent l'activation des voies RAS, ERK et NFκB, empêchant ainsi la différenciation des macrophages murins (Shi et al., 2021). D'autres études ont montré que les vols spatiaux peuvent affecter l'activation des monocytes suite à leur stimulation au LPS en inhibant notamment l'activation de JNK (Verhaar et al., 2014). Les PKC (Protein Kinase C) sont connues pour contrôler le remaniement des microtubules lors de la migration des lymphocytes. En lien avec le réarrangement du cytosquelette observé en condition microgravitaire, des études ont montré que des lymphocytes humains soumis à la microgravité simulée présentent une diminution de leur capacité motrice due à une inhibition de l'activation des PKC (Sundaresan et al., 2002). Enfin, des dérégulations de la signalisation peuvent entraîner l'apoptose de nombreux types cellulaires comme les lymphocytes soumis aux conditions spatiales *via* l'activation de la voie Fas/FasL (Lewis et al., 1998).

3.2.5. Épigénétique et modifications gravitaires

Les études menées quant à l'impact des modifications gravitaires sur les cellules du système immunitaire sont encore aujourd'hui très incomplètes. Bien que l'effet sur le développement ou l'activation des cellules soit de mieux en mieux connu, de nombreuses zones d'ombre persistent quant aux mécanismes par lesquels surviennent ces altérations. Comme décrit précédemment, l'altération de la réponse immunitaire peut parfois être expliquée par des dysfonctionnements de certaines voies de signalisation. Cependant, les avancées récentes en épigénétique ont permis de montrer que les mécanismes épigénétiques régulant notamment l'expression des gènes sont aussi impactés par les altérations gravitaires.

Une étude a ainsi montré que des cellules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées en microgravité simulée présentent une hyperméthylation des cytosines de l'ADN liée à une surexpression de la méthyltransférase MET1. De plus, cette étude a montré que la microgravité entraîne une désacétylation de l'histone H4, une marque de stress chez *Arabidopsis* (Kamal et al., 2018). Il a également été montré que la microgravité simulée est responsable de la différenciation myogénique, et que ce phénomène est sous le contrôle des méthylation de l'ADN. Les travaux de Furukawa et collaborateurs ont montré que la différenciation des myoblastes en myotubes est fortement atténuée en microgravité. Ces résultats sont corrélés à une diminution de certains facteurs myogéniques (Myod1, Myog). L'inhibition de la méthylation de l'ADN pendant la différenciation des myoblastes en microgravité est capable d'inhiber ce

phénomène et de mener à une différenciation normale. Ces résultats montrent que la différenciation des myoblastes est un phénomène dépendant de la méthylation de l'ADN et que la microgravité est capable d'impacter le profil de méthylation et donc la différenciation (Furukawa et al., 2018). Ce résultat a aussi été observé au niveau des lymphocytes humains exposés à une microgravité simulée. En revanche, à l'inverse des myoblastes, les lymphocytes exposés à la microgravité présentent une hypométhylation de l'ADN associée à une dérégulation de l'expression des méthyltransférases DNMT1, DNMT3a, DNMT3b. De plus, cette étude a montré une diminution de l'expression de l'histone désacétylase HDAC1. Cette diminution devrait être liée à une augmentation de l'acétylation de l'histone H3, cependant les auteurs observent une diminution de l'acétylation de l'histone H3 en microgravité. Ces résultats suggèrent que cette dérégulation est liée à une autre HDAC (Singh et al., 2010). Enfin, deux autres études ont montré que les effets de la microgravité sont liés à des modifications d'histones. La première étude a montré que la microgravité augmente le niveau d'H3K4me3 et d'H3K27me3 dans des cellules souches humaines aboutissant à une reprogrammation de la cellule et à la modification de l'expression des marqueurs embryonnaires (e.g. Sox2, Oct3/4, Nanog, E-cadherin) (Gambacurta et al., 2019). Dans la deuxième étude, les auteurs ont montré une augmentation du taux d'H3K27me3 durant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines lorsqu'elles sont soumises à la microgravité simulée (Koaykul et al., 2019).

Toutes ces études mettent en avant l'impact négatif des vols spatiaux sur le système immunitaire, ce qui pourrait augmenter les risques d'infections et de cancers. Il est donc nécessaire de mieux comprendre quels sont les mécanismes par lesquels les changements de gravité affectent le système immunitaire. Pour répondre à cette question, les modifications des voies de signalisation et des mécanismes épigénétiques sont des pistes intéressantes. Une meilleure connaissance des altérations du système immunitaire lors des vols spatiaux, et des mécanismes qui y sont associés, permettra à terme de développer des contremesures permettant de les limiter.

Objectifs

Avec l'effervescence de la conquête spatiale, les missions dans l'espace s'amplifient et leurs durées sont prolongées. Aujourd'hui, nous savons que les conditions extrêmes rencontrées dans l'espace ont un effet délétère sur l'organisme. Ainsi, l'isolement, le confinement, les radiations ou encore les changements de gravité constituent des stress qui impactent les fonctions physiologiques et notamment le système immunitaire. De plus, le développement de vols touristiques augmente la population susceptible d'être impactée par les stress spatiaux et les risques encourus sont d'autant plus élevés que ces personnes ne sont pas entraînées, contrairement aux astronautes. Enfin, les altérations immunitaires observées à la suite de vols spatiaux sont comparables à celles observées lors du vieillissement. Toutefois, ces altérations et les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels ils affectent le système immunitaire restent peu connus.

Ainsi, étudier les effets des stress rencontrés lors des vols spatiaux sur le système immunitaire, est important. Une meilleure appréhension de ces mécanismes permettra à terme de développer des contremesures permettant de limiter leurs effets.

Dans ce contexte, ma thèse a pour but de **comprendre les effets des stress gravitaires sur le système immunitaire, plus particulièrement sur le phénotype et la fonction des DC et sur le développement des LT.**

I. Objectif 1 : Étude des effets du stress microgravitaire sur les cellules dendritiques murines

Les DC, cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, ont la capacité de capter un antigène, de sécréter des cytokines et d'activer les LT en les dirigeant vers un profil adapté au type de pathogène rencontré. Les processus régissant l'activation et la maturation des DC sont essentiels à leurs fonctions. En effet, durant ce processus, les DC vont acquérir des caractéristiques leur conférant des capacités immunogènes ou tolérogènes, garantissant ainsi l'homéostasie de l'organisme tout entier. Bien que centrales au sein de la réponse immunitaire, très peu d'études se sont intéressées à l'impact des stress gravitaires sur les DC. Des études menées au laboratoire ont permis de montrer que des DC soumises à 24h de microgravité simulée grâce à la Random Positioning Machine (RPM) présentent un phénotype moins mature/activé (diminution de l'expression du CMHII et des marqueurs d'activation

CD80, CD86 et CD40 associée à une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tel que l'IP-10, MCP-1 et l'IL-6), des altérations du cytosquelette d'actine et une diminution de leur survie (Thèse J. Jeandel). Ce phénotype moins mature/activé des DC pourrait également être lié à une altération de leur fonction puisqu'il a été montré qu'un tel phénotype pourrait altérer la réponse immunitaire (Liu and Cao, 2015). De telles modifications pourraient alors expliquer l'efficacité amoindrie de la réponse immunitaire des astronautes lors des vols spatiaux (Crucian et al., 2013).

Dans ce premier objectif, mon travail a consisté à compléter les résultats déjà obtenus au laboratoire. Ainsi, nous avons dans un premier temps étudié l'expression des marqueurs de tolérance (e.g. PDL1A) et des cytokines pro-inflammatoires (e.g. IL-6, IL-1 β , IP-10, IL-12 β). Dans le but de comprendre si ces modifications phénotypiques sont corrélées à une altération de leur fonction, la capacité des DC à polariser les LT CD4+ naïf vers un profil immunogène (LTh) ou tolérogène (LTreg) a été étudiée. Nous avons également étudié la prolifération et la survie de ces LT.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires pouvant être à l'origine des modifications phénotypiques et fonctionnelles des DC. Nous nous sommes d'abord intéressés aux voies de signalisation régissant l'état d'activation des DC (ERK, JNK, p38, NF κ B) (Banchereau et al., 2000). Ensuite, sachant que les modifications épigénétiques sont très importantes pour expliquer certaines réponses cellulaires au stress, nous nous sommes intéressés à celles-ci (Gambacurta et al., 2019; Koaykul et al., 2019). En effet, lors d'un stress, la cellule peut subir une modification de son épigénome aboutissant à une modification totale de son transcriptome. En immunologie, une attention particulière est portée à la trimétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (notée H3K27me3) et à la balance méthylase (EZH2)/déméthylase (JMJD3/UTX) qui en est responsable (Burchfield et al., 2015; Margueron and Reinberg, 2011). EZH2 est impliqué dans des processus connus pour être altérés par le stress gravitaire comme le développement, l'activation et la migration des LT (Boonyaratanakornkit et al., 2005; Manna et al., 2015; Su et al., 2005; Tumes et al., 2013), mais également le phénotype et la fonction des DC. Des études récentes ont montré que l'inhibition d'EZH2 diminue l'expression membranaire des marqueurs d'activation des DC dérivées de monocytes humains (Li et al., 2019). De la même manière, dans un modèle auto-immun (modèle murin de la sclérose en plaque), l'inhibition de JMJD3/UTX par l'inhibiteur

sélectif GSK-J4 diminue la sévérité de la maladie (Doñas et al., 2016). Ces effets sont liés à un effet de l'inhibiteur sur les DC qui permet l'apparition d'un phénotype tolérogène caractérisé par une diminution de l'expression de CD80/CD86 et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF α). Ainsi, EZH2 et/ou JMJD3/UTX pourraient être impliqués dans les altérations des DC observées en microgravité. Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'impact de la microgravité et de l'activation des cellules sur l'expression d'EZH2 et de JMJD3/UTX ainsi que sur le taux de triméthylation d'H3K27. Nous avons vérifié l'implication d'EZH2 et de JMJD3/UTX dans le processus d'activation/maturation des DC en étudiant l'état d'activation des cellules après inhibition de la fonction enzymatique d'EZH2 ou de JMJD3/UTX par un inhibiteur spécifique. Enfin, comme peu de données existent sur l'implication de ces enzymes dans la différenciation des DC, nous avons étudié leur implication dans ce processus.

II. Objectif 2 : Étude des effets du stress hypergravitaire sur la lymphopoïèse T

Comme décrit dans le paragraphe IV.3.2.2. de l'introduction, il est bien connu que les modifications de gravité sont susceptibles d'impacter les LT. Des études menées au laboratoire ont montré que le répertoire des chaînes β du TCR est modifié lorsque les animaux se développent en hypergravité (2 *xg*) (Ghislin et al., 2015), suggérant que les processus de formation et/ou de sélection des chaînes TCR β sont impactés par les modifications gravitaires. De plus, il a été montré qu'après 35 jours passés dans l'ISS, les souris présentent un poids thymique réduit, et les analyses RNAseq suggèrent des capacités de prolifération plus faibles des DN (Horie et al., 2019). Cependant, les mécanismes moléculaires responsables des modifications du répertoire TCR β et des dérégulations de la lymphopoïèse T dans des conditions de vol spatial sont inconnus. Dans ce contexte, les dérégulations épigénétiques en réponse au stress gravitationnel sont des pistes intéressantes à explorer, comme le soulignent des études récentes ayant révélé des niveaux accrus d'H3K4me3 et H3K27me3 dans les cellules souches humaines exposées à la microgravité (Gambacurta et al., 2019) et des niveaux inférieurs d'H3K27me3 au niveau de promoteurs spécifiques dans des cellules souches mésenchymateuses humaines différenciées *in vitro* en microgravité (Koaykul et al., 2019). Ces deux études suggèrent qu'H3K27me3 pourrait être affecté par le stress gravitationnel dans différents types de cellules.

Le deuxième objectif de ma thèse a alors consisté à étudier les effets d'un stress gravitationnel sur la lymphopoïèse T en se concentrant sur la modification post-traductionnelle de l'histone

H3K27me3 et l'activité de la méthyltransférase EZH2. Pour cela, nous avons exposé des souris mâles à une hypergravité de 2 *xg* pendant 3 semaines. Nous avons ensuite étudié l'impact de ce stress sur la lymphopoïèse T ainsi que sur le processus de recombinaison V(D)J. Nous avons également analysé le niveau global d'H3K27me3 et d'EZH2 dans les thymus de ces souris. De plus, nous avons utilisé la lignée cellulaire SCIET27, un lignée cellulaire thymique murine double négative, exposée à une hypergravité de 2 *xg* afin d'étudier la triméthylation d'H3K27 au niveau de quatre segments V β . Enfin, nous avons utilisé cette lignée pour étudier l'implication d'EZH2 dans la régulation du taux d'H3K27me3 au niveau des segments V β .

Objectif 1 : Étude des effets du stress microgravitaire sur les cellules dendritiques murines

I. Introduction

Au cours des missions spatiales, les changements de gravité subis par les astronautes affectent de nombreux systèmes dont le système immunitaire. La grande majorité des travaux effectués en microgravité portent sur l'étude des LT. Bien qu'elles soient au centre de la réponse immunitaire, très peu d'études mettent en avant l'impact des variations gravitaires sur les DC. Les quelques études existantes montrent que la microgravité impacte la différenciation, la phagocytose, la production de cytokines, la survie et l'immunogénicité des DC (Low et al., 2018; Monici et al., 2007; Sastry et al., 2001; Stepkowski et al., 2006; Tackett et al., 2019). Ces altérations pourraient expliquer la diminution de leur efficacité de réponse contre les pathogènes (Sastry et al., 2001).

Des études menées au laboratoire ont permis d'évaluer, *in vitro*, les effets de sérums provenant de souris soumises à un stress hypergravitaire (2g) chronique (21 jours) ou aigu (3h) sur le phénotype de maturation/activation des DC. Ces expériences ont révélé une diminution de l'expression en surface de l'ensemble des marqueurs étudiés (CMHII, CD86 et CD40), et ce quelle que soit la durée d'exposition au stress (21 jours ou 3h). De manière intéressante, les mêmes effets ont été observés lorsque des DC sont directement soumises à une microgravité simulée pendant 24h. L'étude du phénotype des DC a montré que la microgravité entraîne une diminution de l'expression membranaire des molécules de costimulation (CD80, CD86 et CD40). Une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (e.g IP-10, MCP-1 et IL-6) a également été observée confirmant le caractère moins mature/activé des DC soumises à ce stress. De plus, l'activation/maturation des cellules avec du LPS permet de récupérer, en partie, un phénotype comparable aux cellules contrôles. Comme le cytosquelette joue un rôle prépondérant dans l'expression de protéines membranaires et est connu pour être modifié par le stress microgravitaire dans d'autres types cellulaires, il a également été étudié. Les résultats mettent en évidence une diminution de la polymérisation de l'actine dans les DC soumises à la microgravité simulée. L'activation/maturation des DC avec du LPS permet de contrecarrer l'altération du cytosquelette d'actine induite par la microgravité. Ces résultats suggèrent que la dépolymérisation du réseau d'actine pourrait participer aux variations de l'expression membranaire des molécules de costimulation en microgravité simulée. Enfin, il a

été montré que la microgravité diminue la viabilité des DC par rapport aux cellules contrôles. Ces différences ne sont plus visibles après activation des cellules avec du LPS. Toutes ces altérations ne semblent toutefois pas modifier la fonction de présentation antigénique des DC soumises à la microgravité.

Ces données montrent que le stress microgravitaire altère le phénotype de maturation/activation des DC ainsi que l'architecture de leur cytosquelette et pourrait également altérer leur fonction. En effet, il a été montré qu'un phénotype plus immature des DC (faible expression des molécules de costimulation à leur surface) pourrait diminuer leurs capacités inflammatoires (Liu and Cao, 2015). Dans ce premier objectif de ma thèse, nous avons voulu approfondir la caractérisation du profil moins mature observé lorsque les DC sont soumises à la microgravité et mesurer son impact sur la fonction de stimulation de la survie, la prolifération et la polarisation des LT CD4⁺ par les DC. Nous avons également voulu comprendre quels étaient les mécanismes moléculaires pouvant expliquer de telles altérations.

II. Matériel et méthodes

1. Animaux

Les BMDC et DC spléniques ont été obtenues à partir de souris mâles C57Bl/6J et les LT CD4 naïfs OTII ont été issus de souris mâles ou femelles C57Bl/6J OT-II ((C57BL/6-Tg (Tcr α Tcr β) 425Cbn/Crl). Les souris étaient âgées de 7 à 14 semaines et provenaient de Charles River, France. Elles ont été acclimatées pendant une semaine et hébergées dans l'animalerie de l'ENSAIA (École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, Vandœuvre-Lès-Nancy, n° d'agrément A54-547-24) ou à l'ACBS (Animalerie du Campus Biologie Santé, Vandœuvre-Lès-Nancy, n° d'agrément C54-547-30) dans des conditions standards d'hébergement (22°C, 50% d'hygrométrie, un cycle inversé jour/nuit de 12h avec accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture). Les souris ont été anesthésiées par inhalation d'un mélange équimolaire entre dioxygène et isoflurane à l'aide d'une station d'anesthésie (Tem Segal, Pessac, France), puis ont été mises à mort par dislocation cervicale (ENSAIA) ou par inhalation de dose croissante de CO₂ (ACBS). Ces procédures ont été réalisées selon les directives Européennes 2010/63/UE.

2. Culture cellulaire

Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute ; Sigma-Aldrich, USA) enrichi avec 10% de SVF (v/v) (Sérum de Veau Fœtal, Thermo Fisher, USA) ; 1 mM de pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich, USA) ; 10 mM d'HEPES (Sigma-Aldrich, USA) ; 0,1 mM de pénicilline (Sigma-Aldrich, USA) ; 0,1 mM de streptomycine (Sigma-Aldrich, USA) ; 10^{-4} mM de 2-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, USA) ; 0,1% d'acides aminés non essentiels (v/v) (Sigma-Aldrich, USA) ; 2 mM de glutamine (Sigma-Aldrich, USA). L'ajout, si besoin, de LPS à 100 ng/mL a permis l'activation/maturation des cellules. Les cellules ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ et 90% d'hygrométrie.

2.1. *Prélèvement de moelle osseuse et différenciation des cellules dendritiques*

Les tibias et les fémurs des souris ont été prélevés. Les extrémités ont été coupées et la moelle osseuse a été extraite par injection de milieu de culture RPMI 1640 complet à une extrémité de l'os permettant la sortie de la moelle par l'autre extrémité. Les cellules ont été dissociées et les globules rouges lysés dans du tampon de lyse RBC (Red Blood Cell lysis buffer, eBiosciences, USA). Les cellules ont étéensemencées en T25 ou T75 (Falcon, USA) à une concentration de 2×10^6 cellules/mL. Afin de différencier les cellules de moelle osseuse en BMDC (DC issues de la différenciation des progéniteurs de la moelle osseuse), 100 ng/mL de Flt-3L (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) ont été ajoutés au milieu de culture (Brawand et al., 2002). Les cellules ont été cultivées pendant 7 jours en changeant la moitié du milieu supplémenté en Flt-3L tous les 2 jours. Ce protocole a permis d'obtenir des BMDC immatures. Le taux de différenciation a été vérifié par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes anti-CD11c-PE-Vio®770 (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne), anti-mPDCA-PE-eFluor®610 (eBiosciences, USA) et anti-CMHII-eFluor450 (eBiosciences, USA). Le pourcentage de BMDC après différenciation était compris entre 75 et 85%.

2.2. *Purification des cellules dendritiques spléniques*

Les rates des souris ont été prélevées et dissociées par un traitement à 1mg/mL de collagénase pendant 30 min à 37°C puis un broyage sur tamis cellulaire de 40 µm (Cell Strainer, Biologix, USA). Les DC ont été purifiées à l'aide du kit de tri de sélection positif CD11c MicroBeads UltraPure (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Les cellules en suspension dans du tampon de tri (PBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, USA), 0,5% BSA (p/v) (Bovin Serum Albumin, Sigma-Aldrich, USA), 2 mM EDTA)

ont été incubées pendant 10 min à 4°C avec 20% (v/v) d'anticorps anti-CD11c couplés à des billes magnétiques et 10% (v/v) de FcR Block (FcR Blocking Reagent, Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne). Après un lavage, les cellules en suspension dans du tampon de tri ont traversé une première colonne placée sur un support magnétique. Après trois lavages successifs réalisés à l'aide de tampon de tri, les cellules ont été récupérées et placées sur une nouvelle colonne. Après 3 nouveaux lavages, les cellules CD11c+ ont été éluées de la colonne. Les DC spléniques ainsi obtenus ont été mises en culture dans du milieu RPMI complet à une concentration comprise entre 1×10^6 et 2×10^6 cellules/mL. La pureté des DC a été vérifiée par cytométrie en flux en utilisant des anticorps anti-CD11c-PE-Vio[®]770 (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne), anti-CD4-APC (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) et anti-CD3-eFluor[®]450 (eBiosciences, San Diego, USA). Le degré de pureté était compris entre 85 et 95%.

2.3. Purification des LT CD4+ OT-II naïfs

Les LT CD4+ OT-II naïfs ont été isolés à partir de la rate et des ganglions lymphatiques des souris C57Bl/6J OT-II en utilisant le kit de tri de sélection négative Naïve CD4+ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne). La rate et les ganglions ont été broyés sur tamis cellulaire de 40 µm (Cell Strainer, Biologix, USA). Les volumes ci-après sont donnés pour 10^8 cellules. Les cellules ont été mises en suspension dans 400 µL de tampon de tri (PBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, USA), 0,5% BSA (p/v) (Bovin Serum Albumin, Sigma-Aldrich, USA), 2 mM EDTA) avec 100 µL de cocktail d'anticorps couplés à la biotine et incubées 5 min à 4°C. 200 µL de tampon de tri, 200 µL de billes anti-biotine et 100 µL de billes anti-CD44 ont été ajoutés à la suspension cellulaire. Une incubation de 10 min à 4°C a été réalisée. Après un lavage, les cellules ont été reprises dans 500 µL de tampon de tri et déposées sur une colonne placée sur un aimant (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne). La colonne a été lavée et la fraction négative contenant les LT CD4+ OT-II naïfs a été récupérée. La pureté du tri a été vérifiée par cytométrie en flux en utilisant des anticorps anti-CD4-APC (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) et anti-CD3-eFluor[®]450 (eBiosciences, USA). Le degré de pureté était compris entre 85 et 95%.

2.4. Inhibition d'EZH2 et de JMJD3

Les cellules ont été mises en culture à 2×10^6 cellules/mL dans du milieu RPMI complet contenant soit 2 µM de l'inhibiteur spécifique d'EZH2 (GSK126), soit 25 nM de l'inhibiteur

spécifique de JMJD3/UTX (GSKJ4), soit du DMSO (condition contrôle). Elles ont été incubées 16 h à 37°C, 5% de CO₂ et 90% d'hygrométrie.

3. Exposition au stress microgravitaire

La RPM (Yuri Gravity, Allemagne) est un dispositif permettant de simuler une microgravité (10⁻³ xg). Elle possède un plateau mis en mouvement par deux bras indépendants qui tournent dans les 3 dimensions à une vitesse variant aléatoirement entre 48 et 72°/sec avec des intervalles de temps et des directions aléatoires et est contrôlée par le logiciel RPM Controller. Les cellules ont été cultivées dans des plaques 96 puits à fond rond (Sarstedt AG & Co, Allemagne) placées sur le plateau de la RPM afin de les soumettre à la microgravité pendant le temps défini par l'expérience. Chaque puits contenait 380 µL de suspension cellulaire. Les puits étant ainsi remplis au maximum, et la plaque de culture a été celée à l'aide d'une membrane adhésive Breathe Easier™ (Diversified Biotech, USA) imperméable aux liquides mais perméable aux échanges gazeux. Ce dispositif a permis de rendre les puits étanches tout en assurant les échanges gazeux et a évité la formation de bulles. L'absence de bulles est nécessaire, car leur présence induirait des forces de cisaillement et donc un stress supplémentaire sur les cellules, ce qui produirait un biais dans l'expérience. La RPM était elle-même placée dans un incubateur pour respecter les conditions optimales de culture (37°C, 5% de CO₂ et 90% d'hygrométrie). Les cellules témoins ont été cultivées dans les mêmes conditions et dans le même incubateur, la plaque de culture étant placée à côté de la RPM.

4. RTqPCR

L'extraction des ARN a été réalisée à l'aide des kits NucleoSpin® RNA Plus ou NucleoSpin® RNA XS provenant de Macherey-Nagel (France) selon les recommandations du fabricant. Les ARN ont été élués dans 30 µL (NucleoSpin® RNA Plus) ou 10 µL (NucleoSpin® RNA XS) d'H₂O RNase free et ont été dosés à l'aide du Nanodrop 2000 (ThermoFisher, Waltham, USA).

La transcription inverse a été réalisée avec 200 ng d'ARN mis en présence d'1 µL de dNTP (désoxyNucléotides Triphosphates) à 10 mM et d'1 µL de Random Hexamer à 50 ng/µL. Le volume a été complété à 12 µL avec de l'eau ultra pure et incubé pendant 5 min à 65°C. 4 µL de tampon 5X (First Strand Buffer), 2 µL de DTT (Dithiothréitol) (0,1 M), 0,5 µL de RNase out (Recombinant Ribonucléase Inhibitor) (40 U/µL) et 0,5 µL de M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (200 U/µL) ont ensuite été ajoutées aux ARN. Le mélange a été incubé à 25°C pendant 10 min, puis à 37°C pendant 50 min et enfin à 70°C

Tableau 1 : Amorces utilisées pour les qPCR

Cible	Séquences	Température d'hybridation (°C)
IL-6	S 5' -AGTCCGGAGAGGAGACTTCA-3' AS 5' -TCCAGTTTGGTAGCATCCATC-3'	61
IL-1 β	S 5' -TTGTGCAAGTGTCTGAAGCAG-3' AS 5' -CTGGATGCTCTCATCAGGACA-3'	62
IP-10	S 5' -GTTGAGATCATTGCCACGATG-3' AS 5' -CTTCACTCCAGTTAAGGAGCC-3'	62
IL-12 β	S 5' -TGTTCGAATCCAGCGCAAGAA-3' AS 5' -TAGCGATCCTGAGCTTGCAC-3'	62
PDL1A	S 5' -CCTCGCCTGCAGATAGTTCC-3' AS 5' -GACGTTGCTGCCATACTCCA-3'	64
JMJD3	S 5' -GTGCCAGCAAGAATGCCAAG-3' AS 5' -CGAGAAGGCATCTCGTTTGC-3'	62
UTX	S 5' -TTACCTGCAGCGAAACGCAC-3' AS 5' -CCAGTGGAAGATAGAGGTTCG-3'	62
GusB	S 5' -CCGATTATCCAGAGCGAGT-3' AS 5' -CTCAGCGGTGACTGGTTTCG-3'	61
Eif3f	S 5' -CATCAAGGCCTATGTCAGCA-3' AS 5' -AGGTCAACTCCAATGCGTTC-3'	61
Ef1a	S 5' -AGAACCAGCCCAGAACCGAA-3' AS 5' -GCAGCTGAGACTCCTTTCCA-3'	61

pendant 5 min. L'ensemble des réactifs utilisés pour la transcription inverse provenaient de la société Invitrogen™, USA. Les incubations ont été réalisées grâce à l'appareil Mastercycler® Personal (Eppendorf, Allemagne). Les ADNc ont été dilués au 1/3 dans de l'H₂O ultra pure avant leur utilisation.

Pour chaque réaction de qPCR, 1,5 µL d'ADNc a été mélangé à 7,5 µL de Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Belgique), 1,5 µL d'amorce sens (1 µM), 1,5 µL d'amorce anti-sens (1 µM) et 3 µL d'H₂O ultra pure. Le programme PCR utilisé a été le suivant : 3 min à 95°C suivi par 40 cycles de 15 sec à 95°C et 1 min aux températures d'hybridation décrites dans le **tableau 1**, une courbe de fusion a ensuite été réalisée afin de s'assurer de la qualité de l'amplification. Chaque mesure a été réalisée en triplicats. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le **tableau 1**. Les qPCR ont été réalisées grâce à la qPCR Mastercycler® Realplex² (Eppendorf, Allemagne). La quantification relative des transcrits d'intérêt a été réalisée par normalisation par rapport à 2 gènes de référence (GusB, Eif3f pour les BMDC, GusB et E1a pour les DC spléniques) selon le modèle de Pfaffl (Pfaffl et al., 2004). L'ensemble des amorces (Eurogentec, Belgique) ont été choisies sur des exons différents afin de s'assurer qu'ils ne puissent pas amplifier d'éventuelles traces d'ADN génomique. Leur spécificité a été vérifiée en utilisant l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur la plateforme NCBI (US National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA)).

5. Extractions protéiques

La totalité des protéines a été extraite dans un tampon de lyse (HEPES 10mM pH 7,9 ; NaCl 0,4 mM ; MgCl₂ 1,5 mM ; EGTA 0,1 mM ; Glycérol 5% (v/v) ; NP-40 0,5% (v/v)) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases et phosphatases (Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail 1X (ThermoFisher, USA)). Les cellules ont été incubées pendant 30 min à 4°C et vortexées régulièrement puis centrifugées à 13 500 *xg*, 10 min à 4°C. Le surnageant contenant la totalité des protéines a été récupéré.

Afin d'extraire les protéines cytoplasmiques et nucléaires séparément, un fractionnement cellulaire a été réalisé. Dans un premier temps, les cellules ont été incubées dans un tampon hypotonique (Tampon A : HEPES 10mM pH 7,9 ; KCl 10 mM ; EDTA 0,1 mM ; EGTA 0,1 mM ; DTT 1mM) supplémenté en inhibiteurs de protéases et phosphatases (ThermoFisher, USA), 15 min à 4°C. 0,6% de NP-40 (v/v) ont ensuite été ajoutées à la suspension cellulaire et les cellules ont été centrifugées à 2 300 *xg*, 5 min, à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines

Tableau 2 : Anticorps utilisés en western blot

Cible	Hôte	Clone	Fournisseur
P-ERK 1/2	Lapin	D13.14.4E	Cell Signaling
ERK 1/2		137F5	
P-JNK		81E11	
JNK		Polyclonal	
P-p38		D3F9	
p38		D13E1	
NFκB p50/p105		D4P4D	
JMJD3		Polyclonal	
GAPDH	Polyclonal		
αtubuline	Chèvre	EP1332Y	Abcam
Actine		Polyclonal	Santa-Cruz
HDAC1		Polyclonal	
IgG Lapin HRP		Polyclonal	Invitrogen

cytoplasmiques, a été récupéré et le culot lavé deux fois dans le tampon A. Le culot a été incubé 1 h à 4°C sous agitation dans un tampon C (HEPES 20 mM pH 7,9 ; NaCl 0,4 mM ; EDTA 1 mM ; EGTA 1 mM ; DTT 1mM) supplémenté en inhibiteurs de protéases et phosphatases (ThermoFisher, USA). Après centrifugation pendant 10 min, à 13 400 *xg*, à 4°C, le surnageant contenant les protéines nucléaires a été collecté.

Les protéines ont été dosées selon la méthode Bradford (Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent, Thermo Scientific, USA) et à l'aide du Nanodrop 2000 (ThermoFisher, USA).

6. Western Blot

10 à 30 µg de protéines ont été dénaturés à 95°C pendant 5 min. La migration des protéines totales et des extraits nucléaires a été réalisée à 120 V sur un gel de polyacrylamide à 14% (v/v) et à 10% (v/v), respectivement. Le transfert a été réalisé sur une membrane PVDF (PolyVinylideneFluoride transfert membrane, Amersham, UK) à 100 V pendant 1h30. Les sites aspécifiques ont été bloqués pendant 1 h dans une solution de PBS Tween 0,1% (v/v) contenant 5% (p/v) de lait ou de BSA selon l'anticorps primaire utilisé et les recommandations du fabricant. Les membranes ont été incubées pendant 16h à 4°C avec un anticorps primaire, puis pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la HRP (HorseRadish Peroxidase). La liste des anticorps utilisés est donnée dans le **tableau 2**. L'immunodétection a été réalisée en utilisant de l'ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, USA) et le signal a été visualisé par chimioluminescence en utilisant la caméra Fusion FX7 (Vilbert-Lourmat). Les membranes ont été strippées grâce à un Antibody Stripping Buffer (Euromedex, France). Pour les protéines totales et nucléaires, la GAPDH (ou l' α -actine) et HDAC1 ont été utilisées comme contrôle de charge respectivement. L'intensité du signal a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health, USA) et normalisée par rapport au contrôle de charge.

7. Prolifération des LT CD4+ OT-II naïfs

Les DC spléniques ont été purifiées et cultivées 24 h à $1,5 \times 10^6$ cellules/mL en microgravité ou non, avec ou sans ovalbumine sous forme peptidique (5 µg/mL) (ova₃₂₃₋₃₃₉, Sigma Aldrich, USA) ou sous forme protéique (200 µg/mL) (Invitrogen, USA) et avec ou sans LPS à 100 ng/mL. Les LT CD4+ OT-II naïfs ont été purifiés et marqués avec un marqueur de prolifération couplé à un fluorochrome e450 (Cell proliferation dye (eBioscience, USA)) en suivant les instructions du fabricant. Les DC ont été lavées 2 fois avec du milieu de culture pour éliminer le LPS et

cocultivées (ratio de 1 DC pour 5 LT) dans un plaque 96 puits avec des LT CD4+ OT-II naïfs marqués. L'expérience a été réalisée en duplicat. Après 3 jours de coculture, les cellules ont été lavées et marquées avec un anticorps anti-CD4-APC (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) et un marqueur de viabilité (Fixable Viability Dye eFluor780 (eBioscience, USA)) pendant 20 min à 4°C. Après un lavage, les cellules ont été fixées pendant 20 min et à 4°C dans du Paraformaldéhyde (PFA) 2% (p/v). Les cellules ont ensuite été lavées et analysées par cytométrie en flux comme décrit ci-dessous.

8. Polarisation des LT CD4+ OT-II naïfs

Les DC spléniques et les LT CD4+ OT-II naïfs ont été purifiés et traités de la même manière que pour les études de prolifération décrites ci-dessus. Les DC ont été lavées 2 fois avec du milieu de culture et mises en culture dans une plaque 96 puits avec des LT CD4+ OT-II naïfs non marqués avec un ratio de 1 DC pour 5 LT. L'expérience a été réalisée en triplicat. Après 4 jours de coculture, les cellules ont été traitées avec du Golgi Plug (BD Bioscience BD Pharmingen, Suisse) comme décrit par le fabricant et avec 20 ng/mL de PMA (Phorbol Myristate Acetate) et 1 µg/mL de ionomycine (Sigma Aldrich, USA). Les cellules ont été incubées 5 h dans des conditions standards de culture puis lavées et marquées avec un anticorps anti-CD4-APC (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) et un marqueur de viabilité (Fixable Viability Dye eFluor780 (eBioscience, USA)) pendant 20 min à 4°C. Après un lavage, les cellules ont été fixées et perméabilisées pendant 30 min à 4°C en utilisant le tampon Fix/Perm issus du kit FoxP3/transcription factor staining buffer set (eBioscience, USA). Après 2 lavages avec un tampon de perméabilisation également issu du kit, les cellules ont été marquées pendant 30 min, à température ambiante, en utilisant des anticorps anti-FoxP3-PE (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne), anti-IFN γ -eFluor450 (eBioscience, USA), anti-IL-4-PEcy7 (eBioscience, USA) et anti-IL-17-FITC (eBioscience, USA). Les cellules ont été lavées 2 fois avec le tampon de perméabilisation et analysées par cytométrie en flux comme décrit ci-dessous.

9. Cytométrie en flux

9.1. Étude du phénotype des BMDC

L'étude de l'expression membranaire des marqueurs d'activation des BMDC a été réalisée en marquant les cellules pendant 20 min à 4°C avec des anticorps anti-CD11b (eFluor450), anti-CD40-APC, anti-CD80-FITC, anti-CD86-PE (eBioscience, USA) et anti-CD11c-PE-Vio[®]770 (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne). Ce mélange d'anticorps a été dilué dans du PBS contenant

0,5% de BSA (p/v), 2mM EDTA et du FcR Block dilué au 1/20^{ème} (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne).

L'étude de l'expression membranaire des marqueurs de tolérance a été réalisée à partir du même protocole de marquage en utilisant des anticorps anti-PDL1 (PE) (Biolegend, USA), anti-CTLA4-APC et anti-CD11c-PE-Vio[®]770 (Miltenyi Biotec GmbH, Germany).

Ce même protocole a été utilisé pour étudier la qualité de différenciation des BMDC en utilisant des anticorps anti-CD11c-PE-Vio[®]770 (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne), anti-mPDCA-PE-eFluor[®]610 et anti-CD11b-FITC (eBioscience, USA).

9.2. Marquage intracellulaire

Afin d'évaluer l'expression intracellulaire d'EZH2, de JMJD3 et le taux d'H3K27me3, un marquage indirect a été réalisé. Pour cela, un marquage membranaire du CD11c et du CMHII a été réalisé comme indiqué ci-dessus. Les cellules ont ensuite été fixées pendant 20 min à 4°C dans du PFA 2% (p/v) puis lavées avec du tampon de perméabilisation (PBS 1X, BSA 2% (p/v), Saponine 0,5% (p/v)). Elles ont ensuite été marquées 1 h à 4°C avec un anticorps primaire anti-EZH2 (Millipore, USA), anti-JMJD3 (Sigma-Aldrich, USA) ou anti-H3K27me3 (Millipore, USA) dilués au 1/100^{ème} dans du tampon de perméabilisation auquel a été ajouté 2% (v/v) de sérum de chèvre (Sigma-Aldrich, USA). Les cellules ont été lavées dans du tampon de perméabilisation et incubées pendant 1 h à 4°C en présence d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome DyeLight488 (Bethyl Laboratories, USA) dilué au 1/200^{ème} dans du tampon de perméabilisation auquel a été ajouté 2% de sérum de chèvre (v/v). Après un lavage dans du tampon de perméabilisation, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux.

9.3. Acquisition et analyse

L'acquisition a été réalisée avec un cytomètre en flux (Gallios (Beckman Coulter, France) ou Celesta Cell Analyzer (BD Bioscience BD Pharmingen, Suisse)) présent à la plateforme de cytométrie UMS2008 IBSLor. L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel FlowJo[®] (BD Bioscience, Suisse).

10. Statistiques

Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide des logiciels StatView (SAS Institute, Cary, NC, USA) et GraphPad Prism (GraphPad Holdings LLC, San Diego, CA, USA). Dans le cas

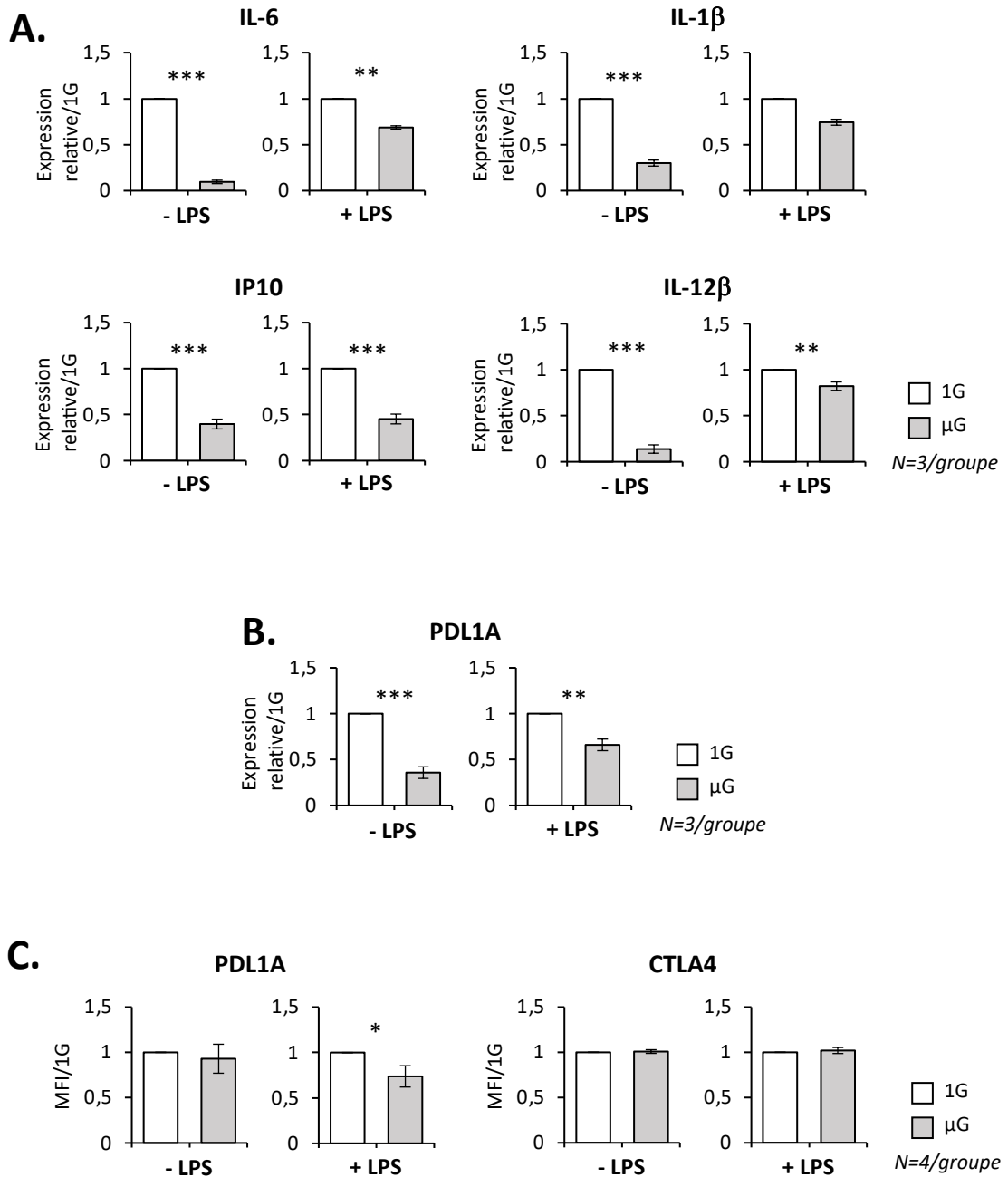


Figure 17 : Les BMDC exposées à la microgravité présentent une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires mais pas d'augmentation de l'expression des marqueurs de tolérance. Des BMDC ont été cultivées 24h en microgravité simulée (μ G) ou non (1G) en absence (-LPS) ou en présence (+LPS) de LPS. (A et B) L'expression des transcrits des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , IP-10 et IL-12 β) (A) ainsi que du marqueur de tolérance PDL1A (B) a été évaluée par RTqPCR. (C) Un marquage membranaire de CD11c ainsi qu'un marquage membranaire de PDL1A ou de CTLA4 a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les graphiques représentent la médiane de l'intensité de marquage exprimé par les cellules CD11c+. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. Les résultats ont été analysés par un test de Student ou Mann Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

de deux groupes indépendants, l'homogénéité des variances a été vérifiée par un test de Fisher et la normalité des valeurs par le test de Kolmogorov Smirnov. Si ces deux critères étaient respectés, un test de Student était réalisé. Si au moins un de ces deux critères n'était pas respecté, un test de Mann Whitney était appliqué. Dans le cas de plus de deux groupes indépendants, si l'homogénéité des variances était vérifiée par un test de Levene, les groupes étaient comparés par ANOVA suivi d'un test *post-hoc* de Tukey-Kramer, sinon, ils étaient comparés par un test de Kruskal Wallis suivi d'un test *post-hoc* de Dunn. Le seuil de risque pour ces études statistiques a été fixé à 5%.

III. Résultats

1. Impact du stress microgravitaire sur le phénotype et la fonction des DC

1.1. Effets de la microgravité sur le phénotype des DC

Comme décrit précédemment, il a été montré au laboratoire que la microgravité entraîne un phénotype immature des DC, caractérisé par une diminution de l'expression membranaire du CMHII et des molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86) ainsi qu'une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (e.g IP10, MCP1 et IL-6). Afin de compléter cette étude antérieure, des BMDC activées ou non au LPS ont été exposées à une microgravité simulée pendant 24h. L'expression des transcrits de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , IP-10, IL-12 β) a ensuite été quantifiée. Les résultats montrent que la microgravité simulée (μ G) diminue de manière globale l'expression relative des transcrits des cytokines pro-inflammatoires étudiées (IL-6, IL-1 β , IP-10, IL-12 β) par rapport au contrôle (1G) (**Figure 17A**). L'activation/maturation avec du LPS semble restaurer partiellement cette production. Ces observations complètent les résultats précédemment obtenus au laboratoire, au niveau protéique et confirment que la microgravité induit un phénotype moins mature/activé des BMDC. Cette régulation semble se faire au niveau transcriptionnel.

Il a été montré qu'un phénotype immature peut, dans certains cas, être caractéristique d'une fonction tolérogène des DC (Liu and Cao, 2015). Ainsi, nous avons voulu savoir si la microgravité est responsable de l'apparition d'un phénotype tolérogène. Pour cela, nous avons étudié l'expression des marqueurs tolérogènes PDL1A et CTLA4 de BMDC activées/maturées ou non et soumises ou non à la microgravité simulée. Au niveau transcriptionnel, nous avons montré que PDL1A est diminué par la microgravité dans les BMDC activées ou non (**Figure 17B**). En revanche, au niveau protéique, l'expression

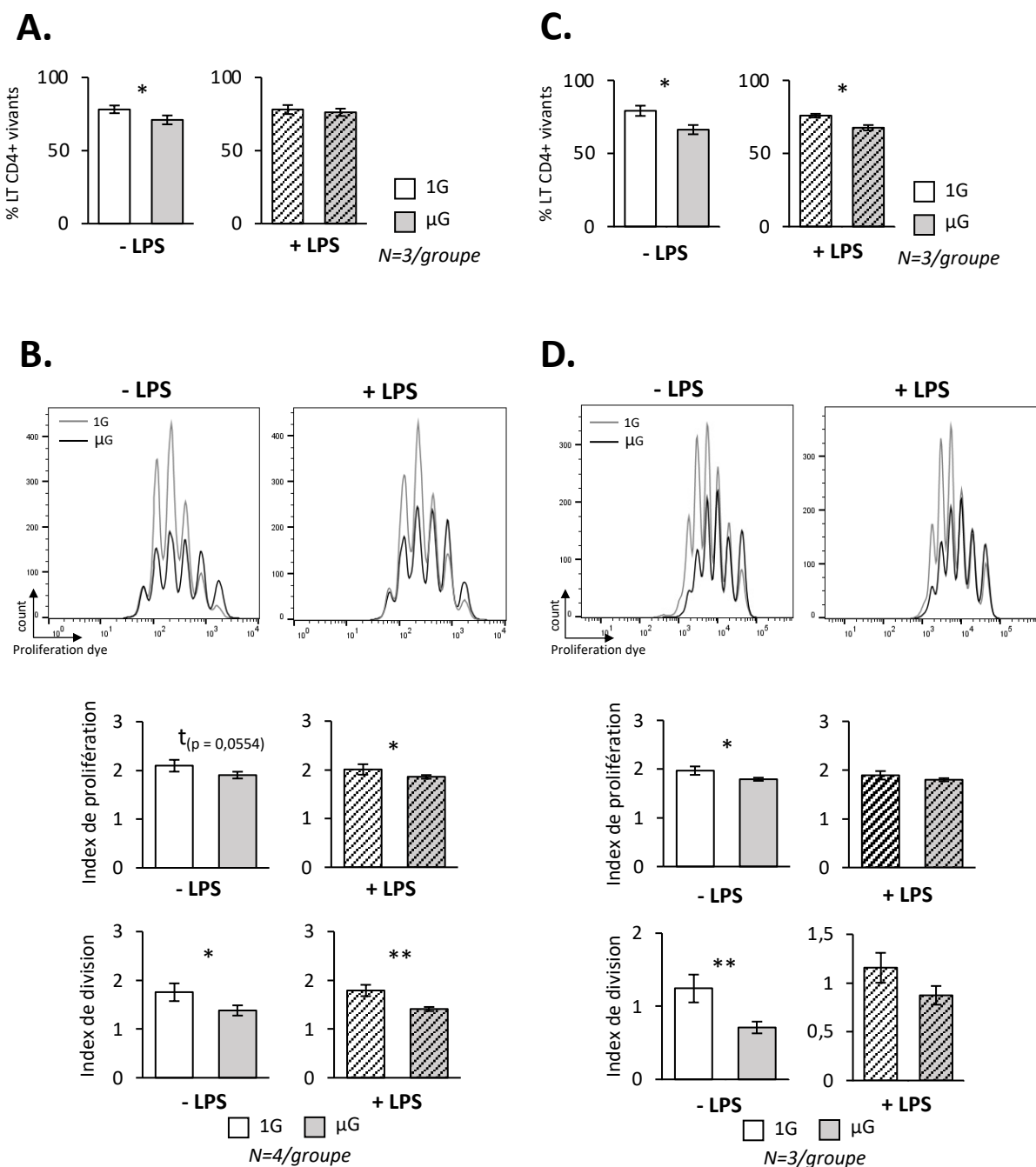


Figure 18 : La microgravité altère la fonction des DC à stimuler la prolifération et la survie des LT CD4+. Des DC spléniques ont été cultivées 24h en microgravité simulée (μ G) ou non (1G) en absence (-LPS) ou en présence (+LPS) de LPS puis mises en présence d'ovalbumine peptidique (ova₃₂₃₋₃₃₉) (A et B) ou protéique (C et D). Une coculture avec des LT CD4+ isolés de souris OTII a été réalisée pendant 3 jours. La viabilité (A et C) ainsi que les index de prolifération et de division (B et D) des LT ont été analysés par un marquage utilisant un marqueur de viabilité ou un marqueur de prolifération respectivement. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les graphiques représentent des moyennes +/- SEM. Test de Student ou de Mann-Whitney. * p < 0,05, ** p < 0,01, t indique une tendance.

membranaire de PDL1A n'est pas affectée par la microgravité dans les BMDC inactivées et diminue dans les BMDC activées (**Figure 17C**). En ce qui concerne CTLA4, son expression membranaire n'est pas affectée par la microgravité quel que soit l'état d'activation des cellules (**Figure 17C**).

L'ensemble de ces résultats montrent donc que la microgravité diminue l'expression des transcrits des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 β , l'IP-10 et l'IL-12 β et n'engendre pas d'augmentation de l'expression des marqueurs de tolérance étudiés à la surface des DC. Le stress microgravitaire semble donc diminuer le phénotype immunogène des DC plutôt que d'induire leur état tolérogène.

1.2. Effets de la microgravité sur la fonction des DC

Nous avons voulu savoir si les altérations du phénotype ont un impact sur la fonction des DC. Pour cela, des DC spléniques soumises ou non à la microgravité et activées/maturées avec du LPS ou non ont été mises en présence d'ovalbumine puis en présence de LT CD4+ naïfs purifiés à partir de souris OTII (possédant un TCR transgénique reconnaissant spécifiquement l'ovalbumine de poulet).

Nous avons ensuite analysé la capacité des DC à induire la prolifération et la polarisation des LT CD4+. La survie et la prolifération des LT CD4+ ont été analysées à J3 et la polarisation à J4. Pour cela, nous avons déterminé le profil des sous-populations de LT CD4+ obtenus (Th1, Th2, Th17, Treg) en étudiant l'expression des facteurs de transcription spécifiques ou le profil cytokinique produit (IFN γ , IL-4, IL-17, FoxP3 respectivement). Ces expériences ont été faites avec soit de l'ovalbumine sous forme peptidique (ova₃₂₃₋₃₃₉), soit sous forme protéique. Contrairement à la forme protéique, le peptide n'est pas découpé lorsqu'il est internalisé par les DC afin d'être présenté. Cette approche nous permet de faire la discrimination entre un défaut d'internalisation et d'apprêtement de l'ovalbumine par les DC ou un défaut d'activation des LT CD4+ lié au phénotype immature des DC.

Nos résultats montrent que lorsque les LT CD4+ sont activés avec des DC pulsées avec l'ovalbumine peptidique (ova₃₂₃₋₃₃₉) et soumises à la microgravité, ils survivent moins et prolifèrent moins (**Figure 18A et B**). La baisse de prolifération des LT CD4+ est mise en évidence par une diminution des index de prolifération (nombre total de divisions/nombre de cellules qui se sont divisées) et de division (nombre total de divisions/nombre de cellules au

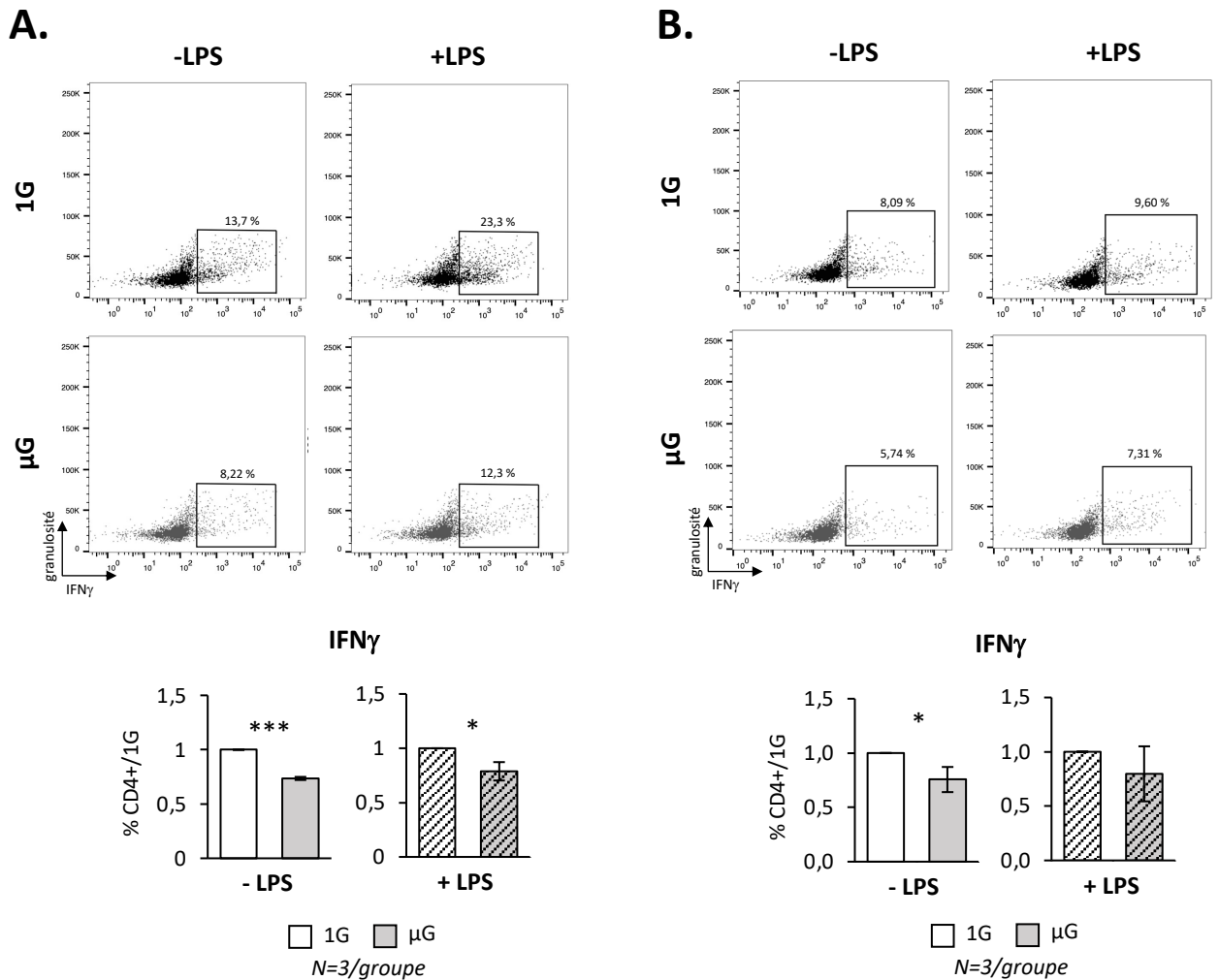


Figure 19 : La microgravité diminue la polarisation par les DC immatures des LT CD4+ vers un profil Th1. Des DC spléniques ont été cultivées 24h en microgravité simulée (μG) ou non (1G) en absence (-LPS) ou en présence (+LPS) de LPS puis mises en présence d'ovalbumine peptidique (ova₃₂₃₋₃₃₉) (A) ou protéique (B). Une coculture avec des LT CD4+ isolés de souris OTII a été réalisée pendant 4 jours. Après coculture, les LT ont été mis en présence d'un inhibiteur de golgi et de PMA/ionomycine pendant 6h. Un marquage membranaire de CD4 ainsi qu'un marquage intracellulaire de l'IFNγ a été réalisé. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les nuages de points (panel du haut) représentent l'analyse représentative de trois expériences indépendantes du marquage de l'IFNγ au sein de la population cellulaire CD4+. Les graphiques (panel du bas) représentent des moyennes +/- SEM. Les résultats ont été analysés par un test de Student ou de Mann-Whitney. * p < 0,05 ; *** p < 0,001.

départ). Ces résultats indiquent que la microgravité altère les capacités des DC à induire une prolifération normale des LT CD4+. Moins de cellules prolifèrent, et celles qui le font, prolifèrent moins que les LT CD4+ activés par des DC cultivées à 1G.

Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque les DC sont cultivées avec l'ovalbumine protéique (**Figure 18C et D**). Ainsi, ces résultats suggèrent que la microgravité diminue la capacité des DC à stimuler la prolifération et la survie des LT CD4+ et que ce défaut ne semble pas provenir d'un défaut d'apprêtement mais semble être lié au phénotype immature des DC observé en microgravité.

De plus, la polarisation des LT CD4+ par les DC entraîne principalement une polarisation en Th1 (entre 13 et 25% pour l'ovalbumine peptidique et entre 8 et 10% pour l'ovalbumine protéique). Cette polarisation en Th1 est marquée par la production d'IFN γ par les LT CD4+. Cette polarisation en Th1 est diminuée d'environ 25 % par rapport au contrôle lorsque les LT CD4+ sont polarisés par des DC activées ou non soumises à la microgravité en utilisant l'ovalbumine peptidique (**Figure 19A**). Des résultats similaires ont été obtenus pour les LT CD4+ polarisés par des DC non activées avec de l'ovalbumine protéique (**Figure 19B**). La différence n'est toutefois plus visible lorsque les DC ont été activées (**Figure 19B**). Cette différence obtenue avec l'ovalbumine protéique pourrait être dû au fait que l'activation des LT CD4+ avec des DC est moins importante qu'avec l'ovalbumine peptidique. En effet, une étude comparant la polarisation avec la forme peptidique ou protéique de l'ovalbumine a montré que les LT CD4+ produisent moins d'IL-2 lorsqu'ils sont polarisés par des DC cultivés avec l'ovalbumine protéique (Tackett et al., 2019). Dans ce cas, l'activation des LT CD4+ est moins importante et les différences qu'il peut y avoir entre les différentes conditions expérimentales peuvent être moins marquées.

L'ensemble de ces résultats montre que la microgravité diminue la capacité des DC à stimuler la survie, la prolifération et la polarisation des LT CD4+ vers un profil Th1. De plus, ce phénomène semble être indépendant de l'internalisation et de l'apprêtement de l'ovalbumine puisque les mêmes résultats sont obtenus lorsque les DC sont cultivées en présence d'ovalbumine peptidique. Le défaut de stimulation des LT par les DC serait donc lié à la diminution des molécules de costimulation et du CMHII observée en condition microgravitaire.

2. Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans les altérations des DC soumises au stress microgravitaire

Afin de comprendre comment la microgravité altère le phénotype et la fonction des DC, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires pouvant être à l'origine de ces modifications. Nous avons d'abord étudié les voies de signalisation régissant l'activation des DC (MAPK, NFκB). Ensuite, sachant que les modifications épigénétiques sont très importantes pour expliquer certaines réponses cellulaires au stress, nous nous sommes intéressés à celles-ci et plus particulièrement au rôle d'EZH2/JMJD3 dans ces processus.

2.1. Effets de la microgravité sur les voies de signalisation régissant l'activation/maturation des DC

L'altération des fonctions immunitaires peut s'expliquer par des dérégulations des voies de signalisation régissant diverses fonctions cellulaires (e.g. activation, prolifération, réorganisation du cytosquelette et survie). L'activation/maturation des DC est possible par l'activation de la voie NFκB mais également des voies MAPK comme ERK 1/2, p38 et JNK (Banchereau et al., 2000). Les activations de ces voies de signalisation, et notamment de la voie NFκB, JNK et p38, sont responsables de l'acquisition du phénotype d'activation des DC, indispensable à leurs fonctions (Banchereau et al., 2000; Nakahara et al., 2004). La voie ERK 1/2, quant à elle, est plutôt responsable de la survie des DC (Rescigno et al., 1998). De nombreuses études ont montré que ces différentes voies de signalisation peuvent être impactées par le stress microgravitaire (Shi et al., 2021; Verhaar et al., 2014), pouvant alors entraîner un défaut d'activation, de maturation ou la mort des cellules du système immunitaire. De ce fait, l'altération par la microgravité des voies de signalisation MAPK (ERK/JNK/p38) ou NFκB, responsables de l'activation et de la survie des DC, pourrait expliquer l'apparition du phénotype immature des DC soumises à la microgravité.

Pour cela, des BMDC soumises ou non à la microgravité pendant 24h ont été activées/maturées au LPS. L'état d'activation de ERK1/2, JNK et p38 MAPK a été analysé par western blot après 0, 15, 30 et 60 minutes de stimulation en mesurant l'expression des protéines sous leur forme totale et phosphorylée (activée). La même cinétique a été utilisée pour suivre l'activation de NFκB (p50) en étudiant sa translocation nucléaire. Nos résultats montrent que l'ajout de LPS induit l'activation des trois voies de MAPK, comme attesté par l'augmentation du ratio quantité de protéine phosphorylée/protéine totale, dès 15 minutes,

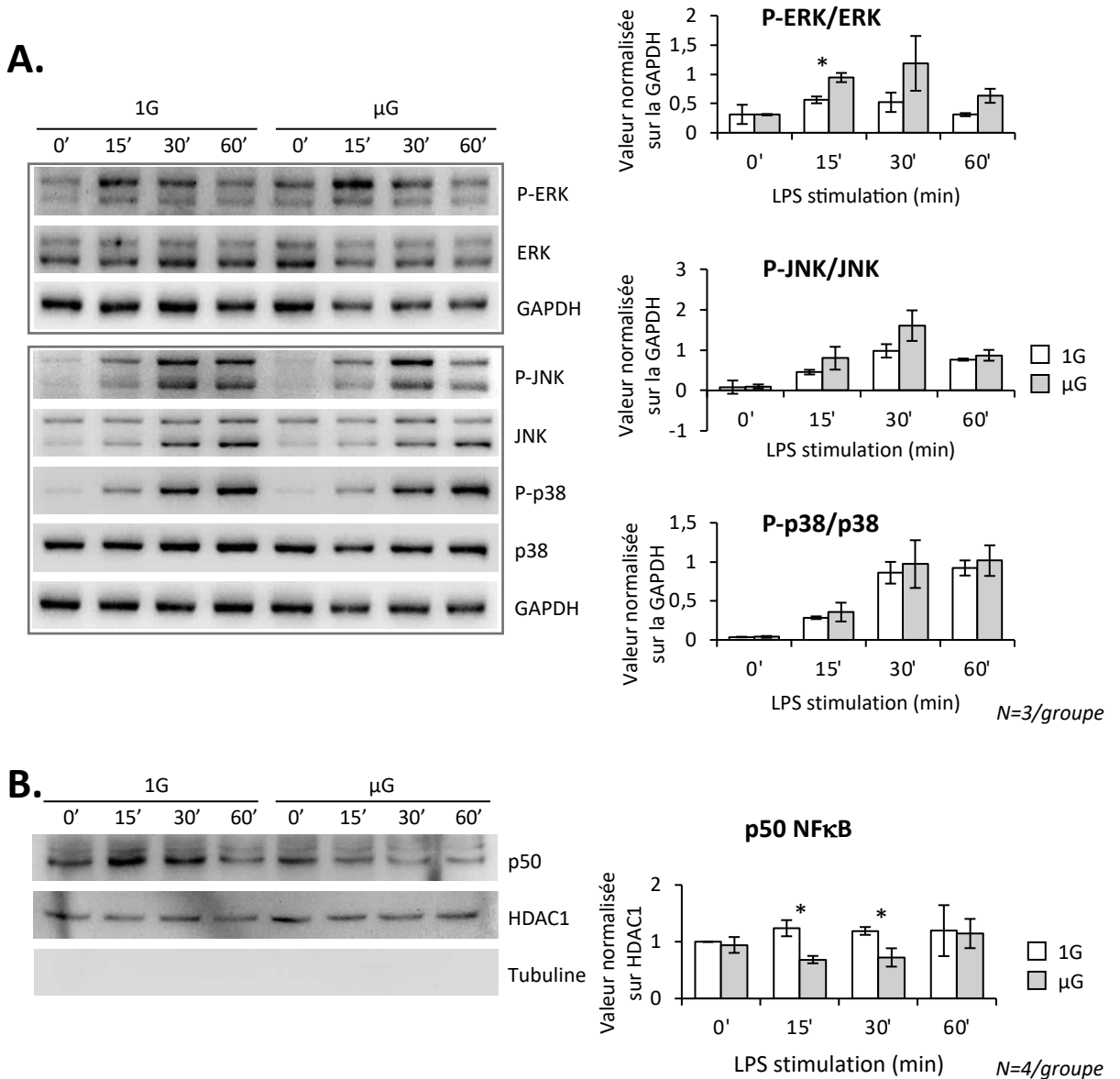


Figure 20 : L'exposition à la microgravité diminue l'activation de la voie de signalisation de p50 NF κ B mais pas les voies des MAPK. Les BMDC ont été exposés (μ G) ou non (1G) à la microgravité. Après 24h de culture, les cellules ont été activées pendant 0, 15, 30 ou 60 min à l'aide de LPS. **(A)** L'activation de ERK, JNK et p38 MAPK a été analysée par western blot. Le panneau de gauche présente un western blot représentatif de trois expériences indépendantes. Le panneau de droite présente des histogrammes de la quantification de la forme phosphorylée de la protéine correspondante normalisée sur la protéine totale et la GAPDH. **(B)** La relocalisation nucléaire de la sous-unité NF κ B p50 a été analysée par western blot de la fraction nucléaire. Le panneau de gauche présente un western blot représentatif de quatre expériences indépendantes. Le panneau de droite présente l'histogramme de la quantification de p50 normalisée sur HDAC1. Les graphiques représentent des moyennes \pm SEM. Les résultats ont été analysés par un test de Student ou de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

dans les BMDC soumises ou non à la microgravité (**Figure 20A**). De plus, la microgravité ne semble pas impacter la cinétique d'activation de JNK et p38 alors qu'elle entraîne une activation plus importante de la voie ERK1/2 par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats indiquent que l'altération du phénotype de maturation des BMDC, induite par le stress microgravitaire, n'est pas liée à une diminution de l'activation des MAPK.

En ce qui concerne NFκB, nos résultats montrent que la microgravité altère la voie d'activation de NFκB comme l'atteste la diminution de la translocation nucléaire de p50 dans les DC soumises à la microgravité par rapport aux cellules contrôles après 15 et 30 minutes de stimulation. (**Figure 20B**). Ce défaut d'activation pourrait donc expliquer le phénotype immature des DC lorsqu'elles sont soumises à la microgravité.

2.2. Effets de la microgravité sur EZH2 et JMJD3/UTX

L'altération des fonctions immunitaires pourrait également s'expliquer par des dérégulations de certains mécanismes épigénétiques. En effet, des études ont révélé des niveaux accrus d'H3K4me3 et H3K27me3 dans les cellules souches humaines exposées à la microgravité (Gambacurta et al., 2019) et des niveaux inférieurs d'H3K27me3 au niveau de promoteurs spécifiques de cellules souches mésenchymateuses humaines différenciées *in vitro* en microgravité (Koaykul et al., 2019). Ces deux études suggèrent qu'H3K27me3 pourrait être affecté par le stress gravitationnel dans différents types de cellules. De manière intéressante, il a été montré qu'EZH2 est impliqué dans des processus connus pour être altérés par le stress gravitaire comme le développement, l'activation et la migration des LT (Boonyaratanakornkit et al., 2005; Manna et al., 2015; Su et al., 2005; Tumes et al., 2013) mais également le phénotype et la fonction des DC. Des auteurs ont montré que l'inhibition d'EZH2 diminue l'expression membranaire des marqueurs d'activation des DC dérivées de monocytes humains (Li et al., 2019). De la même manière, dans un modèle auto-immun (modèle murin de la sclérose en plaque), l'inhibition de JMJD3/UTX par l'inhibiteur sélectif GSK-J4 diminue la sévérité de la maladie (Doñas et al., 2016). Ces effets sont liés à un effet de l'inhibiteur sur les DC qui permet l'apparition d'un phénotype tolérogène ou moins inflammatoire caractérisé par une diminution de l'expression de CD80/CD86 et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNFα). Ces observations font d'EZH2 et JMJD3/UTX des cibles privilégiées qui permettraient d'expliquer les altérations phénotypiques et fonctionnelles des DC observées en microgravité.

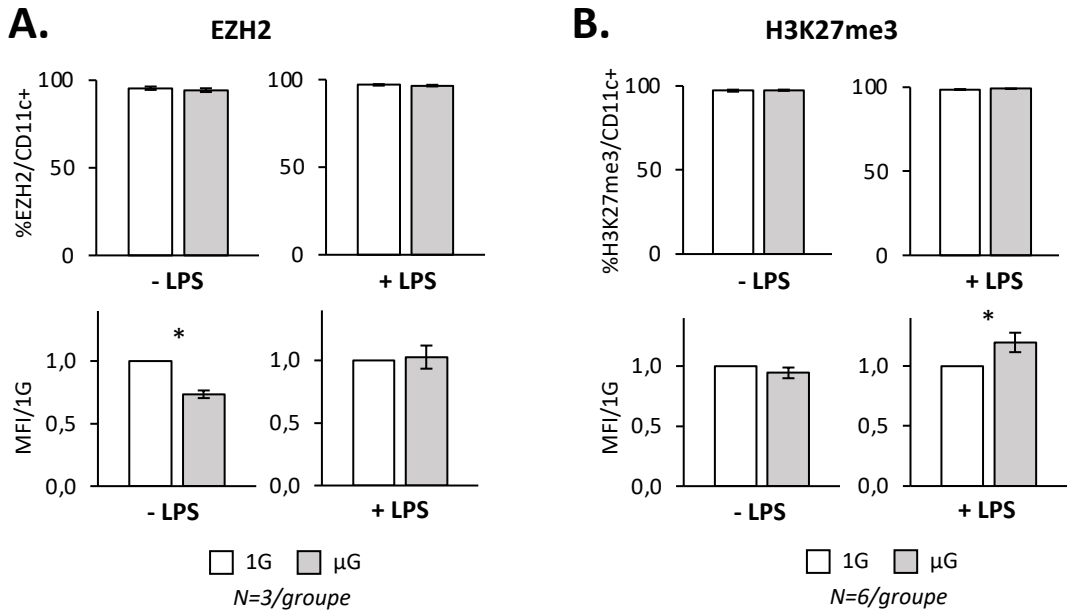


Figure 21 : Les BMDC exposées à la microgravité présentent une modification de l'expression d'EZH2 et du taux d'H3K27me3. Des BMDC ont été cultivées 24h en microgravité simulée (μG) ou non (1G) en absence (-LPS) ou en présence (+LPS) de LPS. Un marquage membranaire de CD11c ainsi qu'un marquage intracellulaire d'EZH2 ou d'H3K27me3 a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules positives ou la médiane de l'intensité de marquage pour EZH2 (A) ou pour H3K27me3 (B) exprimé par les cellules CD11c+. Les histogrammes représentent la moyenne +/- SEM. Les résultats ont été analysés par un test de Mann Whitney. * p < 0,05.

Dans le but de comprendre si la microgravité est susceptible d'altérer l'expression d'EZH2 et sa fonction de triméthylation d'H3K27me3, nous avons dans un premier temps, analysé l'expression protéique d'EZH2 et le taux d'H3K27me3 dans des BMDC activées ou non et soumises ou non à la microgravité. Nos résultats montrent que la quasi-totalité des cellules expriment EZH2 (**Figure 21A panel du haut**) et sont positives à la triméthylation d'H3K27 (**Figure 21B panel du haut**) quel que soit leur état d'activation. Cependant, la microgravité modifie le niveau d'expression d'EZH2 (**Figure 21A panel du bas**) et le taux d'H3K27me3 (**Figure 21B panel du bas**). En effet, nous observons dans des BMDC immatures, une diminution de l'expression d'EZH2 (28 %) sans que le niveau de triméthylation d'H3K27 ne soit modifié. Dans les BMDC matures, l'expression d'EZH2 n'est pas modifiée par la microgravité mais le niveau d'H3K27me3 augmente (20 %). Ainsi, la microgravité modifie l'expression d'EZH2 mais de manière non corrélée à sa fonction de triméthylation d'H3K27. Ces résultats pourraient suggérer que la microgravité altère la balance méthylase/déméthylase. En effet, si cette balance est à l'équilibre, le taux de triméthylation devrait être stable, si elle penche en faveur des déméthylases ou des méthylases, le niveau d'H3K27me3 serait diminué ou augmenté, respectivement. Pour vérifier cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à JMJD3 et UTX, les principales déméthylases d'H3K27.

Nous avons étudié l'impact de la microgravité simulée pendant 24h sur l'expression transcriptionnelle de ces deux déméthylases dans des BMDC activées ou non. Nos résultats ont montré que la microgravité entraîne une diminution de l'expression transcriptionnelle de JMJD3 (50%), que ce soit dans les BMDC activées ou non (**Figure 22A panel de gauche**) alors que l'expression des transcrits d'UTX est inchangée (**Figure 22A panel de droite**). Le stress microgravitaire pourrait donc déséquilibrer la balance méthylase/déméthylase en diminuant l'expression d'EZH2 et de JMJD3, ce qui expliquerait que le taux d'H3K27me3 reste stable.

Nous avons ensuite voulu confirmer la diminution de l'expression de JMJD3 au niveau protéique. Contrairement à ce qui était attendu, nous avons montré par western blot (**Figure 22B**) et par cytométrie en flux (**Figure 22C**) que le niveau d'expression de JMJD3 est augmenté en condition microgravitaire dans les BMDC immatures par rapport aux BMDC cultivées en normogravité. De manière intéressante, l'activation par le LPS permet aux BMDC contrôles d'exprimer JMJD3 à un niveau comparable à celui des BMDC en microgravité. (**Figure 22B, C**). Ainsi, nos résultats montrent que, bien que l'expression transcriptionnelle de JMJD3 soit plus

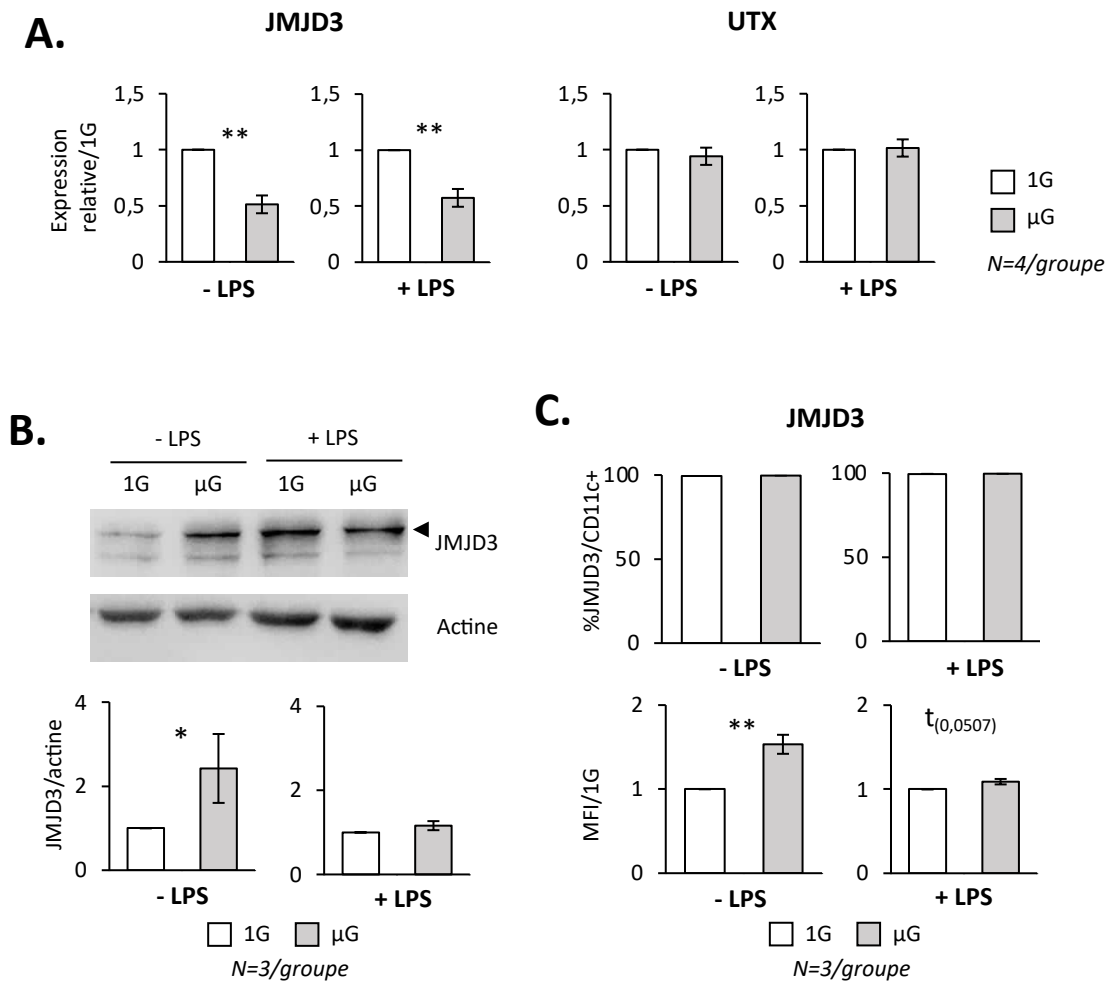


Figure 22 : La microgravité diminue l'expression transcriptionnelle de JMJD3 et augmente son expression protéique dans les BMDC immatures. Des BMDC ont été cultivées 24h en microgravité simulée (μG) ou non (1G) en absence (-LPS) ou en présence (+LPS) de LPS. (A) L'expression relative des transcrits de JMJD3 et UTX a été quantifiée par RTqPCR. (B) L'expression protéique de JMJD3 a été analysée par western blot. Le western blot présenté est représentatif des résultats. Les graphiques représentent la quantification des western blot normalisée par rapport à l'expression de l'actine. La flèche montre la bande spécifique de JMJD3. (C) Un marquage membranaire de CD11c ainsi qu'un marquage intracellulaire de JMJD3 ont été réalisés et analysés par cytométrie en flux. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules CD11c positives exprimant JMJD3 ou la médiane de l'intensité de marquage exprimé par les cellules CD11c+. L'ensemble des histogrammes représentent la moyenne +/- SEM. Les résultats ont été analysés par un test de Student ou Mann Whitney. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; t indique une tendance.

faible dans les BMDC soumises à la microgravité pendant 24h, son expression protéique est plus importante (BMDC inactivées) ou inchangée (BMDC activées) que dans les cellules contrôles. Ainsi, ces variations d'expression de JMJD3 ne permettent pas d'expliquer le taux d'H3K27me3 malgré les modulations de l'expression d'EZH2 induites par 24h de microgravité.

Il a été montré dans des macrophages, que l'expression de JMJD3 pouvait être régulée plus précocement (De Santa et al., 2009). Ainsi, une cinétique plus courte a été réalisée. Pour cela, des BMDC ont été activées ou non avec du LPS et soumises ou non à la microgravité pendant 0, 1, 2 ou 6 heures. L'expression protéique de JMJD3 a ensuite été étudiée par western blot. Nos résultats montrent que les BMDC immatures ne présentent pas de modification de l'expression de JMJD3, qu'elles soient cultivées ou non en condition microgravitaire (**Figure 23 panel du haut**). En revanche, la microgravité est capable d'augmenter l'expression de JMJD3 dans les BMDC activées soumises à la microgravité après 2 et 6 heures alors que cette augmentation n'est pas observée dans les cellules cultivées en normogravité (**Figure 23 panel du bas**). Ainsi, cette expérience révèle que la microgravité ne diminue pas précocement l'expression de JMJD3.

L'ensemble de ces résultats suggère que les expressions protéiques d'EZH2 et de JMJD3 ne peuvent pas expliquer à elles seules les modifications d'H3K27me3 observées en condition microgravitaire. En effet, dans des BMDC immatures soumises à la microgravité, EZH2 diminue et JMJD3 augmente, ce qui devrait aboutir à une diminution d'H3K27me3, or cette triméthylation reste stable. De plus, dans les BMDC activées, H3K27me3 augmente en microgravité alors que les expressions d'EZH2 et JMJD3 restent stables. Il est donc possible : 1) qu'un ou plusieurs autres acteurs interviennent tels que la méthyltransférase EZH1 pouvant méthyler H3K27 ou 2) que les fonctions d'EZH2 et JMJD3 soit modifiées par la microgravité, indépendamment de son expression.

2.3. Implication d'EZH2 et JMJD3/UTX dans la régulation de la différenciation et de du phénotype d'activation/maturation des DC

2.3.1. Rôle dans la différenciation

Diverses études ont montré qu'EZH2 joue un rôle primordial dans le développement des cellules immunitaires et notamment dans le développement des LT (Mochizuki-Kashio et al., 2011; Su et al., 2005). Il a été montré chez la souris, qu'un KO d'EZH2 ne semble pas modifier la proportion des différentes sous-populations de DC en périphérie (Gunawan et al., 2015).

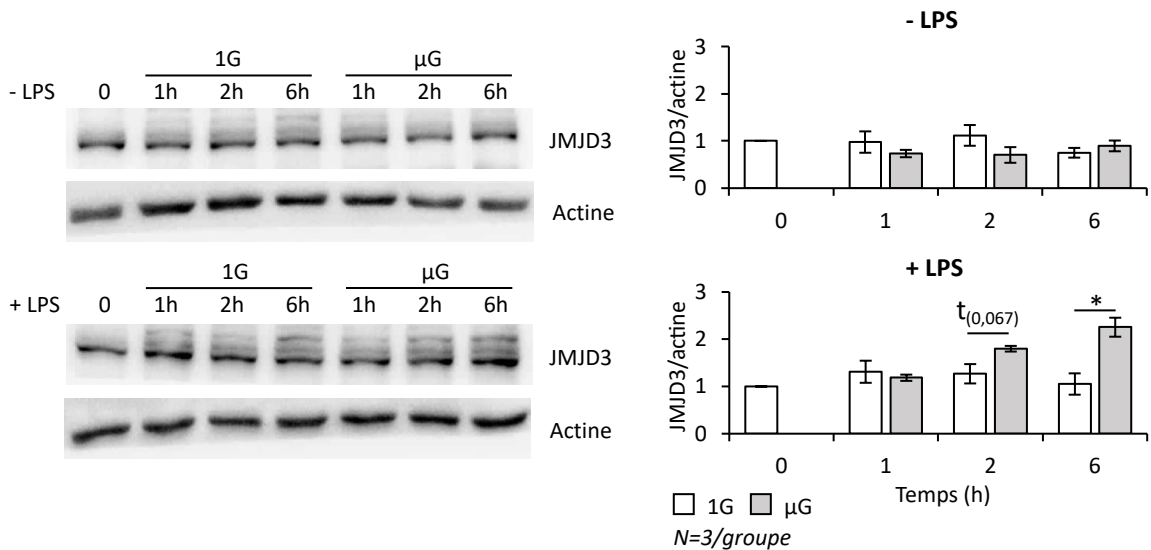


Figure 23 : La microgravité augmente l'expression protéique de JMJD3 après 2 et 6h dans les BMDC matures mais pas dans les BMDC immatures. Des BMDC ont été activées (+LPS) ou non (-LPS) pendant 1h. Les cellules ont ensuite été soumises (μG) ou non (1G) pendant 0, 1, 2 ou 6 heures à la microgravité. L'expression de JMJD3 a été analysée par western blot. Le panneau de gauche présente un western blot représentatif de trois expériences indépendantes. Le panneau de droite présente des histogrammes de la quantification de JMJD3 normalisé par rapport à l'actine. Les graphiques représentent des moyennes +/- SEM. Les résultats ont été analysés par un test de Student * $p < 0,05$, t indique une tendance.

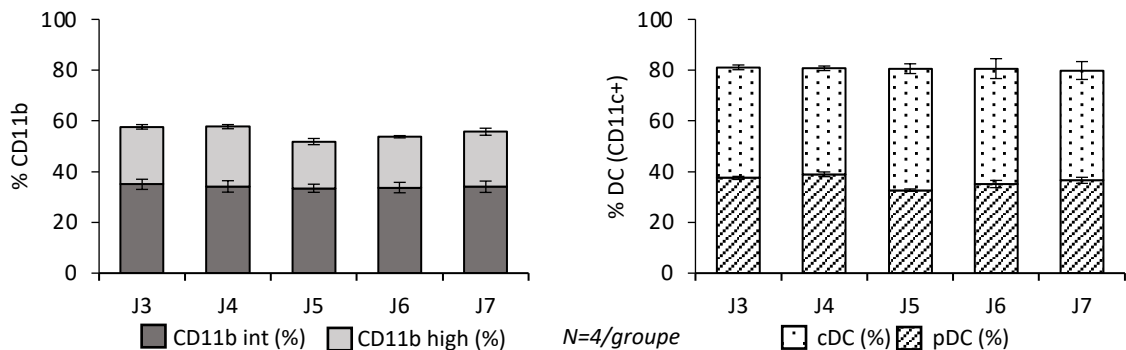


Figure 24 : L'inhibition de l'activité méthyltransférase d'EZH2 n'a pas d'effet sur la différenciation des BMDC. Des cellules de moelle osseuse ont été mises en différenciation pendant 7 jours avec du Flt-3L afin d'obtenir des BMDC. L'activité méthyltransférase d'EZH2 a été inhibé au moyen de GSK 126 à 2 μM au 3ème (J3), 4ème (J4), 5ème (J5) ou au 6ème (J6) jour de différenciation. La condition J7 correspond aux cellules différenciées sans inhibiteur. Un marquage membranaire de CD11c, mPDCA et de CD11b a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les résultats représentent le pourcentage de cellules positives. Les cDC sont les cellules CD11c+mPDCA- et les pDC sont les cellules CD11c+mPDCA+. Les histogrammes représentent la moyenne +/- SEM. Les résultats ont été analysés par ANOVA ou un test de Kruskal Wallis.

Cependant, cette étude ne s'est pas intéressée aux effets directs de ce KO sur la différenciation dans la moelle osseuse et s'est focalisée exclusivement sur les cDC. Afin de compléter ces données, nous avons voulu savoir si EZH2 est important pour la différenciation *in vitro* des BMDC grâce au Flt-3L. Nous avons mis des cellules de moelle osseuse en différenciation en BMDC pendant 7 jours et inhibé l'activité méthyltransférase d'EZH2 à 3, 4, 5 et 6 jours de différenciation en utilisant un inhibiteur spécifique d'EZH2 (GSK126). Nous avons comparé la qualité de la différenciation obtenue à celle obtenue au bout de 7 jours sans inhibiteur, en étudiant, par cytométrie en flux, le pourcentage de cellules CD11b+ (un marqueur précoce de la différenciation), de cellules différenciées (CD11c+) ainsi que la répartition cDC vs pDC. Nos résultats montrent que l'inhibition de l'activité méthyltransférase d'EZH2, aux temps indiqués, n'entraîne pas de modification du pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD11b, suggérant qu'il n'y a pas de blocage de la différenciation des BMDC (**Figure 24 panel de gauche**). De plus, nous n'observons pas de modification des pourcentages de BMDC différenciées ni des pourcentages de cDC et de pDC et ce, quel que soit le stade de différenciation au moment de l'inhibition d'EZH2 (**Figure 24 panel de droite**). Ces résultats nous amènent donc à penser que l'activité méthyltransférase d'EZH2 n'est pas essentielle à la différenciation des BMDC.

2.3.2. Rôle dans l'activation/maturation

Nos études sur EZH2 et JMJD3/UTX en microgravité nous ont amené à penser que ces enzymes pourraient être importantes pour l'activation/maturation des cellules en normogravité. L'analyse de l'expression d'EZH2 et de JMJD3 ainsi que leur fonction *via* la méthylation d'H3K27 dans des BMDC activées ou non a montré que la quasi-totalité des BMDC, activées ou non, expriment EZH2 et JMJD3 et sont positives pour la triméthylation d'H3K27 (**Figure 25A panel du haut**). Cependant, le niveau d'expression d'EZH2 et de JMJD3 ainsi que le taux d'H3K27me3 est augmenté par la stimulation au LPS par rapport aux BMDC non activées (**Figure 25A panel du bas**). Ces résultats montrent donc une augmentation d'expression d'EZH2 et de JMJD3 lors du processus de maturation des BMDC et celle-ci est corrélée à une augmentation du niveau de triméthylation d'H3K27. Ainsi, ces résultats laissent penser qu'EZH2 et JMJD3 pourraient être impliquées dans les processus d'activation/maturation des BMDC.

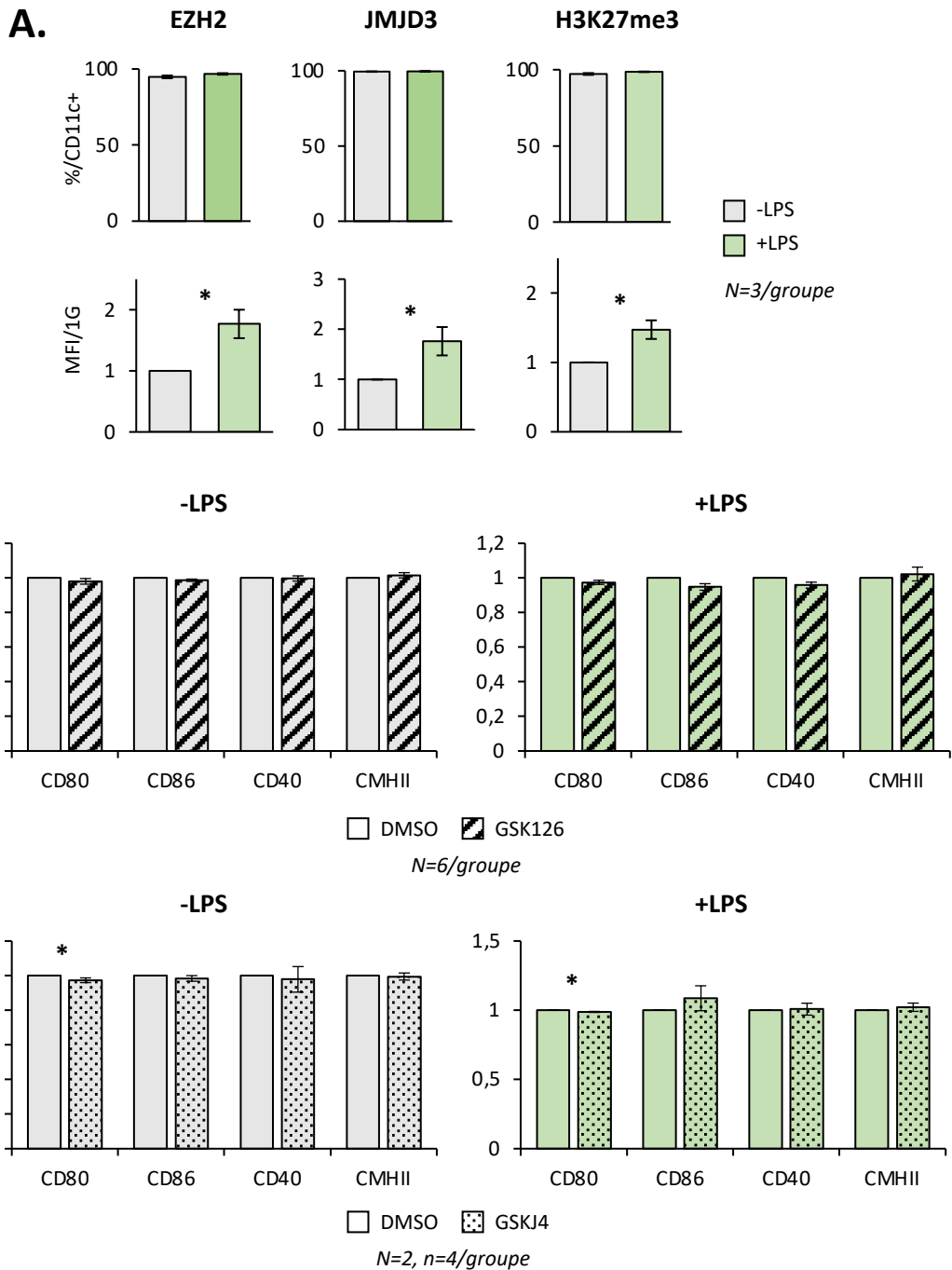


Figure 25 : Rôle d'EZH2 et de JMJD3 dans l'activation/maturation des BMDC. (A) Des

BMDC ont été cultivées 24h en absence (-LPS) ou en présence (+LPS) de LPS. Un marquage membranaire de CD11c ainsi qu'un marquage intracellulaire d'EZH2 ou de JMJD3 ou d'H3K27me3 ont été réalisés et analysés par cytométrie en flux. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules doubles positives pour CD11c et EZH2 ou JMJD3 ou H3K27me3 ainsi que la médiane de l'intensité de marquage exprimé par les cellules CD11c+. (B et C) Des BMDC ont été cultivées en présence (+LPS) ou en absence (-LPS) de LPS et de GSK126 à 2 μ M (B) ou de GSKJ4 à 25 nM (C) pendant 24h. Le DMSO a été utilisé comme contrôle. Un marquage membranaire de CD11c, CD40, CD80, CD86 et CMHII a été réalisé et analysé par cytométrie en flux. Les résultats représentent la médiane d'intensité du marquage reflétant l'intensité d'expression des marqueurs. Les histogrammes représentent la moyenne +/- SEM. Les résultats ont été analysés par un test de Student ou Mann Whitney. * p < 0,05.

Afin de déterminer si EZH2 joue un rôle dans l'activation/maturation des BMDC, nous avons inhibé la fonction méthyltransférase d'EZH2 à l'aide d'un inhibiteur spécifique (GSK126) et nous avons étudié l'expression membranaire des marqueurs d'activation (CD80, CD86, CD40, CMHII). Nos résultats montrent que l'inhibition de l'activité méthyltransférase d'EZH2 dans les BMDC immatures ou matures n'a pas d'effet sur l'expression de ces marqueurs (**Figure 25B**). Ces résultats indiquent que, bien que son expression augmente pendant l'activation/maturation, la fonction méthyltransférase d'EZH2 ne semble pas indispensable à l'activation/maturation des BMDC.

Sachant qu'il a été montré que JMJD3 contrôle l'expression de certains gènes inflammatoires lors de l'activation/maturation des macrophages par le LPS (De Santa et al., 2009), nous avons complété cette étude en vérifiant dans notre modèle, si l'inhibition de JMJD3 (GSKJ4) faisait apparaître un phénotype immature des BMDC comparable à celui observé en microgravité. Nos résultats montrent que l'inhibition de l'activité de JMJD3 n'entraîne pas de diminution de l'expression membranaire des marqueurs d'activation étudiés dans les BMDC activées ou non (**Figure 25C**). Une diminution significative de CD80 de 2 à 3 % est observée lorsque les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de JMJD3, mais cette diminution bien que significative est trop faible par rapport à la diminution observée en condition microgravitaire. Ces résultats semblent donc montrer que, tout comme la fonction méthyltransférase d'EZH2, la fonction déméthylase de JMJD3 n'est pas impliquée dans l'activation/maturation des DC même si l'expression de JMJD3 augmente pendant ce processus.

IV. Discussion et perspectives

Pendant les missions spatiales, les astronautes sont confrontés à des changements gravitaires connus pour affecter diverses fonctions physiologiques dont le système immunitaire. Bien que centrales au sein de l'immunité, très peu d'études ont examiné l'impact des modifications gravitaires sur les DC.

Les DC sont essentielles à l'orchestration de la réponse immunitaire et font le lien entre réponse innée et adaptative. De nombreuses études montrent que la fonction des DC est directement liée à leur état de maturation. Des travaux antérieurs effectués au laboratoire ont montré que les DC sont sensibles au stress induit par des changements de gravité. En effet, quelle que soit leur origine (DC spléniques ou BMDC), les DC soumises à un stress microgravitaire présentent un phénotype plus immature que les cellules cultivées en

normogravité. Cette baisse de maturité est caractérisée par la diminution de l'expression membranaire du CMHII et des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 ainsi qu'une diminution de leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Cet état immature a souvent été associé à une diminution de l'état inflammatoire ou une fonction tolérogène des DC (Liu and Cao, 2015). De plus, le stress microgravitaire entraîne des modifications du cytosquelette d'actine et diminue leur survie. Ainsi, le stress microgravitaire induirait un profil moins inflammatoire des DC.

1. Effet du stress microgravitaire sur le phénotype et la fonction des DC

Dans ce contexte, nous avons cherché à savoir si la microgravité est susceptible d'induire une fonction tolérogène des DC. Nous avons confirmé que la microgravité diminue l'état pro-inflammatoire des DC en montrant une diminution des transcrits de l'IL-6, l'IL-1 β , l'IP-10 et l'IL-12 β . Ces résultats complètent et confirment ceux obtenus précédemment. L'étude de l'expression membranaire des marqueurs de tolérance CTLA4 ou PDL1A a montré que la microgravité ne modifie pas leur expression dans les BMDC non activées. Seul PDL1A est diminué par la microgravité dans les BMDC activées par rapport aux cellules contrôles. Ainsi, la microgravité n'entraîne pas d'augmentation de l'expression de ces deux marqueurs de tolérance et les DC soumises à la microgravité ne présentent pas un phénotype tolérogène au sens strict mais plutôt une diminution de leur phénotype pro-inflammatoire.

Le phénotype de maturation ayant un impact direct sur la fonction des DC, nous avons voulu savoir si le phénotype observé en microgravité modifie la capacité des DC à stimuler la prolifération, la survie et la polarisation des LT CD4+. Les résultats que nous avons obtenus montrent que la microgravité diminue la capacité des DC à stimuler la survie, la prolifération et la polarisation des LT CD4+ en Th1. Ce phénomène semble être indépendant de l'internalisation et de l'apprêtement de l'ovalbumine puisque des résultats sensiblement identiques ont été observés lorsque les DC sont cultivées en présence d'ovalbumine peptidique. Le défaut de stimulation des LT par les DC pourrait donc être lié à la diminution des molécules de costimulation et du CMHII ainsi qu'à la baisse de production des cytokines pro-inflammatoires observées en condition microgravitaire.

Nos résultats complètent le peu d'études menées à ce sujet et notamment l'étude de Tackett et collaborateurs qui a montré une augmentation de l'état d'activation des DC lié à l'augmentation de l'expression des marqueurs d'activation (CMHII, CD80, CD86, CD40, IL-6)

lorsque les cellules sont cultivées en microgravité (clinostat 2D) pendant un temps court (<72h) (Tackett et al., 2019). De plus, les DC exposées à un temps court de microgravité ont une capacité augmentée à activer les LT CD4+ et CD8+ contrairement aux DC soumises à la microgravité pendant un temps long (Tackett et al., 2019). A première vue, ces résultats semblent discordants avec les nôtres. Cependant, ces différences peuvent être expliquées par le modèle cellulaire utilisé. En effet, Tackett et collaborateurs ont utilisé des BMDC différenciées au GM-CSF ou la lignée JAWII stimulée grâce à un cocktail contenant de l'IFN- γ , de l'IL-4 et du TNF α . A l'inverse, nous avons utilisé des BMDC différenciées au Flt-3L, un modèle qui se rapproche le plus des conditions physiologiques avec des cellules qui sont dans un état beaucoup moins inflammatoire que les BMDC différenciées au GM-CSF (Brawand et al., 2002). Compte tenu de l'état fortement activé des cellules utilisées par Tackett et collaborateurs, nous pourrions penser qu'il faut beaucoup plus de temps à la microgravité simulée pour avoir un impact sur l'expression des marqueurs inflammatoires et sur leur fonction. Ceci pourrait expliquer la dichotomie de nos résultats respectifs.

Les expériences de polarisation des LT CD4+ ont également montré que dans nos conditions, les DC, qu'elles soient activées ou non, ou exposées ou non à la microgravité, polarisent principalement les LT CD4+ vers un profil Th1. Ces résultats peuvent être expliqués par la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , IP-10, IL-12 β) par les DC soumises à la microgravité et notamment par la diminution de la production de l'IL-12 β , une cytokine nécessaire à la polarisation en Th1. De plus, les études précédentes menées au laboratoire n'ont pas montré d'induction, par la microgravité, de la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF β) nécessaires à l'induction du profil Treg (Schmidt et al., 2012). Notre étude n'a pas non plus montré d'augmentation par la microgravité de l'expression des marqueurs de tolérance (PDL1A, CTLA4) qui sont eux aussi essentiels à l'induction du profil Treg. Ainsi, nos résultats sur la polarisation des LT CD4+ concordent avec le phénotype et le profil cytokinique des DC exposées à la microgravité. Tackett et collaborateurs, ont également étudié les effets de la microgravité sur leurs modèles de DC et ces auteurs ont montré qu'un temps court de microgravité (<72h) augmente la capacité des DC à activer les LT CD4+ et CD8+ contrairement aux DC soumises à la microgravité pendant un temps long (5 jours) (Tackett et al., 2019). Ces données, basée sur la production de l'IL-2 (pour les LT CD4+) et de l'IFN γ (pour les LT CD8+) semblent à première vue opposées aux nôtres. Cependant, cette discordance

peut encore une fois être expliquée par le modèle cellulaire utilisé dans cette étude (Voir paragraphe précédent).

Pour conclure, nos résultats montrent que la microgravité diminue la production de cytokines pro-inflammatoires et confirment le phénotype immature des DC. Ces DC ne présentent pas de fonction tolérogène au sens strict du terme puisqu'elles n'induisent pas un profil Treg, mais présentent une capacité pro-inflammatoire diminuée. Ainsi, la microgravité entraîne l'apparition d'un phénotype et d'une fonction moins inflammatoire des DC. Cet état pourrait expliquer la diminution de leur efficacité de réponse contre les pathogènes en condition microgravitaire (Sastry et al., 2001) et donc les troubles immunitaires observés chez près de la moitié des astronautes (Crucian et al., 2016; Mehta et al., 2014).

2. Étude des mécanismes moléculaires responsables des altérations des DC soumises à la microgravité

2.1. Étude des voies de signalisation impliquées dans l'activation/maturation

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les altérations phénotypiques et fonctionnelles des DC induites par la microgravité, nous avons étudié ses effets sur l'activation de différentes voies de signalisation. Ces voies, telles que celles des MAPK et NFκB, ont été décrites comme importantes lors du processus d'activation/maturation des DC et/ou lors des vols spatiaux (Nakahara et al., 2004; Rescigno et al., 1998; Verhaar et al., 2014). Il a ainsi été montré que l'altération de l'activation des DC lors des vols spatiaux est notamment due à une altération de l'activation de NFκB (Boonyaratankornkit et al., 2005). De plus, des études sur des macrophages ont montré une suractivation de la voie p38 MAPK en microgravité augmentant leur phénotype pro-inflammatoire (Wang et al., 2015) ainsi qu'une altération de l'action des voies RAS, ERK et NFκB empêchant leur différenciation (Shi et al., 2021). Enfin, Verhaar et collaborateurs ont montré que les vols spatiaux peuvent affecter l'activation des monocytes suite à leur stimulation au LPS en inhibant notamment l'activation de JNK (Verhaar et al., 2014). Nos résultats ont montré que les voies d'activation ERK1/2, JNK et p38 sont bien activées après induction de la maturation par le LPS mais que la microgravité ne diminue pas leur activation. La voie ERK1/2 est même augmentée par le stress microgravitaire. La diminution du phénotype de maturation induite par le stress microgravitaire n'est donc pas liée à une diminution de l'activation des MAPK. Toutefois, l'exacerbation de l'activation de la voie

ERK1/2 dans les BMDC soumises à un stress microgravitaire pourrait être liée à l'état plus immature des BMDC cultivées dans ces conditions. En effet, il a été montré que la voie ERK1/2 est plus sensible à l'activation dans des DC bloquées au stade immature (Rescigno et al., 1998). Cette activation plus importante de ERK1/2 dans ces cellules serait corrélée à une augmentation de la survie de ces dernières. De manière intéressante, des travaux menés au laboratoire ont montré que l'induction de la maturation des BMDC soumises à la microgravité permet d'inhiber l'augmentation d'apoptose induite par le stress microgravitaire. Ainsi, nous pourrions supposer que le signal de survie médié par l'activation plus importante de la voie ERK1/2 dans les BMDC soumises à la microgravité permettrait de limiter leur apoptose.

Concernant l'activation de NFκB, nous avons montré que son activation suite à la stimulation au LPS pendant 15 et 30 minutes est diminuée lorsque les cellules sont soumises à la microgravité. Compte tenu de l'effet prépondérant de NFκB dans l'acquisition du phénotype mature des DC à travers son rôle dans l'activation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6, IL-12) et des marqueurs d'activation (CD80, CD40) (Liu et al., 2017), ce défaut d'activation pourrait expliquer le phénotype immature des DC lorsqu'elles sont soumises à la microgravité. En effet, de précédentes études sur les LT ont montré que l'altération de leur activation lors des vols spatiaux est notamment due à un défaut d'activation de NFκB (Boonyaratanakornkit et al., 2005; Chang et al., 2012). Afin de valider cette hypothèse, une expérience de ChIP pourrait être réalisée afin de savoir si la microgravité est susceptible de modifier la présence de NFκB sur les promoteurs du TNF, de l'IL-6, de l'IL-12 ou encore de CD80 et CD40 ce qui pourrait expliquer un défaut de l'activation de leur expression et donc le phénotype immature des DC.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les modifications phénotypiques et fonctionnelles observées dans les DC soumises à la microgravité ne seraient pas liées à un défaut d'activation des MAPK mais pourraient être liées à un manque d'activation de NFκB.

2.2. Étude de EZH2 et JMJD3/UTX

2.2.1. Effet de la microgravité sur l'expression et la fonction d'EZH2 et JMJD3/UTX

De par les nombreuses similitudes existantes entre les effets du KO d'EZH2 ou l'inhibition de JMJD3/UTX et les effets des stress gravitaires, EZH2 et JMJD3/UTX sont des cibles qui

pourraient permettre d'expliquer les altérations phénotypiques et fonctionnelles des DC observées en microgravité. En effet, il a été montré qu'EZH2 est impliqué dans des processus connus pour être altérés par le stress gravitaire comme le développement, l'activation et la migration des LT (Boonyaratanakornkit et al., 2005; Manna et al., 2015; Su et al., 2005; Tumes et al., 2013) mais également le phénotype et la fonction des DC (Thèse J. Jeandel). Des études récentes ont montré que l'inhibition d'EZH2 diminue l'expression membranaire des marqueurs d'activation des DC dérivées de monocytes humains (Li et al., 2019). De la même manière, dans un modèle auto-immun (modèle murin de la sclérose en plaque), l'inhibition de JMJD3/UTX par l'inhibiteur sélectif GSK-J4 diminue la sévérité de la maladie (Doñas et al., 2016). Ces effets sont liés à un effet de l'inhibiteur sur les DC qui permet l'apparition d'un phénotype tolérogène caractérisé par une diminution de l'expression de CD80/CD86 et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF α). Ainsi, nous avons voulu savoir si les effets du stress microgravitaire pouvaient s'expliquer par des altérations de l'expression et/ou de la fonction d'EZH2 et/ou JMJD3/UTX.

Afin de répondre à cette question, nous avons tout d'abord étudié l'expression d'EZH2, de JMJD3/UTX et le niveau de triméthylation d'H3K27 qui résulte de l'activité de ces enzymes. Nos résultats sur l'expression des transcrits de JMJD3 et d'UTX ont montré que la microgravité diminue l'expression transcriptionnelle de JMJD3 quel que soit l'état d'activation des BMDC mais que l'expression des transcrits d'UTX n'est pas modifiée. Nous nous sommes donc focalisés sur JMJD3 pour la suite de l'étude. Au niveau protéique, nous avons montré que dans les BMDC immatures soumises à la microgravité, EZH2 diminue, JMJD3 augmente et le niveau d'H3K27me3 reste stable. De plus, dans les BMDC activées, H3K27me3 augmente en microgravité alors que l'expression d'EZH2 et JMJD3 reste stable. Ces résultats montrent que la microgravité est bien capable de moduler l'expression d'EZH2, JMJD3 et le taux d'H3K27me3. Cependant, les modulations du taux d'H3K27me3 observées en condition microgravitaire ne sont pas corrélées aux niveaux d'expression du couple EZH2/JMJD3. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'un ou plusieurs autres acteurs interviennent tels que la méthyltransférase EZH1 pouvant méthyle H3K27. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la microgravité sur l'expression d'EZH1 (Shen et al., 2008). Une deuxième hypothèse pouvant expliquer ce résultat serait que la fonction d'EZH2 et JMJD3 soit modifiée par la microgravité, indépendamment de son expression. En effet, nous pouvons imaginer que

la microgravité modifie les cibles d'EZH2 et de JMJD3. Or, l'analyse globale de la triméthylation que nous avons effectuée ne permet pas d'analyser les cibles déméthylées et celles méthylées. Il est important de rappeler que la diminution ou l'augmentation globale de la triméthylation d'H3K27 n'est pas toujours le signe d'une augmentation ou d'une diminution de la triméthylation locale. C'est pour cette raison qu'il serait intéressant de réaliser un ChIP afin de déterminer la répartition différentielle d'EZH2, JMJD3 et H3K27me3 sur les promoteurs de certaines cibles (e.g. CD86, IL-6, IL-1 β et IL-12) en condition microgravitaire et normogravitare. De manière intéressante, il a notamment été montré que JMJD3 contrôle la transcription de l'IL-12 *via* STAT3 et STAT4 (LaMere et al., 2017).

De plus, bien que le rôle principal d'EZH2 soit la triméthylation d'H3K27me3 (voie canonique), une voie non canonique d'EZH2 a été mise en évidence récemment. Dans cette voie, le complexe PRC2 participe à la régulation de l'activité de protéines non-histones. Il a notamment été montré qu'EZH2 est responsable de la méthylation et de l'activation de STAT3 dans les glioblastomes (Kim et al., 2013).

EZH2 méthyle également des protéines du cytosquelette comme la taline et contrôle la migration des DC (Gunawan et al., 2015). Enfin, une étude récente a montré qu'EZH2 a un rôle dans les stades précoces de la lymphopoïèse T en interagissant avec le centre organisateur des microtubules (Deshayes et al., 2022). Ainsi, il se pourrait que le stress microgravitaire module la localisation intracellulaire d'EZH2 et favorise sa localisation nucléaire. Dans ce cas, la voie canonique d'EZH2 serait avantagée par rapport à la voie non canonique (localisation cytoplasmique) et EZH2 pourrait, bien qu'en plus faible quantité, assurer son rôle de triméthylation d'H3K27. JMJD3 a, lui aussi, une fonction indépendante de sa fonction de déméthylation. Il a été montré qu'il est capable d'interagir avec des coactivateurs de la transcription ainsi que des facteurs de transcription dans la région promotrice de certains gènes cible afin d'activer leur transcription (Salminen et al., 2014). Il est tout à fait envisageable qu'il ait aussi une fonction intracytoplasmique. Il serait donc intéressant, à l'avenir, d'étudier la fonction intracytoplasmique d'EZH2 et de JMJD3 notamment en étudiant leur localisation intracellulaire. De plus, sachant qu'EZH2 est capable de méthyler et réguler l'activation de STAT3 (Kim et al., 2013) et que ce dernier intervient dans des processus influencés par le stress, à savoir la différenciation et l'activation des DC (Laouar et al., 2003;

Melillo et al., 2010), il serait intéressant d'étudier l'impact de la microgravité sur la méthylation et l'activation de STAT3.

Nos résultats concernant l'expression de JMJD3 ont montré que son expression transcriptionnelle n'est pas corrélée à son expression protéique puisque nous observons une diminution des transcrits en microgravité alors que la forme protéique augmente. Cette observation suggère une régulation post-transcriptionnelle de JMJD3. Le défaut d'activation de NFκB que nous avons observé en microgravité pourrait expliquer la diminution de l'expression des transcrits de JMJD3. En effet, NFκB participe à la régulation transcriptionnelle de JMJD3 grâce à des éléments de réponse à NFκB présents sur son promoteur (De Santa et al., 2009). Il serait donc possible que la microgravité, en diminuant l'activation de NFκB, diminue la transcription de JMJD3. A l'avenir, il serait intéressant de comparer, par CHIP, la présence de NFκB sur le promoteur de JMJD3 en condition microgravitaire ou non.

2.2.2. Implication d'EZH2 et de JMJD3 dans la différenciation et l'activation/maturation des DC

Nous avons montré qu'EZH2 ne semble pas intervenir dans la différenciation des BMDC. En effet, le traitement des BMDC en cours de différenciation avec un inhibiteur spécifique de l'activité méthyltransférase d'EZH2 n'impacte pas leur différenciation. Ces résultats sont en accord avec une étude dans un modèle auto-immun montrant que le KO d'EZH2 ne modifie pas la proportion de DC en périphérie (Gunawan et al., 2015). Cependant, cette étude ne s'est pas intéressée pas à la différenciation dans la moelle osseuse, elle a simplement étudié la proportion de DC périphériques. De nombreuses études ont montrées que la triméthylation d'H3K27 est une modification importante pour la différenciation de nombreuses cellules du système immunitaire tels que les LT (Mochizuki-Kashio et al., 2011; Su et al., 2005). Il se pourrait donc qu'elle soit également importante pour la différenciation des DC bien qu'EZH2 ne semble pas avoir de rôle. De ce fait, il serait intéressant d'approfondir cette étude en utilisant un inhibiteur spécifique de JMJD3 (GSKJ4) afin d'identifier son rôle potentiel dans la différenciation des BMDC.

Les études que nous avons menées pour mettre à jour les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération de l'activation des DC par les conditions microgravitaires laissent penser qu'EZH2 et JMJD3 sont importants pour l'activation/maturation des DC. De la même manière,

des travaux ont montré que la délétion du gène EZH2 dans des macrophages ou des DC de la peau entraîne une diminution de leur activation (Loh et al., 2018; Z.-J. Zhang et al., 2018). De plus, une étude menée sur un modèle auto-immun a montré que l'inhibition de l'activité de JMJD3 entraîne l'apparition d'un phénotype moins mature des DC (Doñas et al., 2016). Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de ces deux enzymes ainsi qu'au taux d'H3K27me3 en condition normogravitaire dans des BMDC activées ou non.

Nous avons montré que l'expression d'EZH2 et de JMJD3, ainsi que le niveau d'H3K27me3, sont augmentés par l'activation/maturation des cellules laissant penser qu'EZH2 et JMJD3 sont importants dans ce processus. Afin de démontrer l'implication de la fonction d'EZH2 et/ou JMJD3 dans la maturation des BMDC, nous avons inhibé la fonction méthyltransférase ou déméthylase d'EZH2 ou de JMJD3 et avons étudié le phénotype d'activation des cellules à travers l'expression membranaire du CMHII et des molécules de costimulation. Dans les deux cas, nous avons montré que l'inhibition d'EZH2 ou JMJD3 ne modifie pas le phénotype d'activation des cellules et ainsi, que ni EZH2, ni JMJD3 ne semblent essentielles à l'activation/maturation des BMDC. Ces résultats ne sont pas en accord avec les conclusions des études montrant que l'inactivation d'EZH2 ou l'inhibition de JMJD3 diminuent l'activation des DC (Doñas et al., 2016; Loh et al., 2018; X. Zhang et al., 2018). Cette différence entre nos résultats et ceux de ces études peut principalement être expliquée par le modèle cellulaire qui diffère par rapport au notre (macrophage, DC de la peau, DC spléniques). Par exemple, Doñas et al. ont utilisé des DC spléniques ou des BMDC différenciées grâce à un traitement au GM-CSF. Ces cellules présentent un profil basal plus inflammatoire que les BMDC différenciées au Flt-3L que nous avons utilisées (Brawand et al., 2002). Cet état moins inflammatoire des BMDC différenciées au Flt-3L est caractérisé par une plus faible expression des marqueurs d'activation étudiés (CD40, CD80, CD86, CMHII). Ainsi, la potentielle diminution de ces marqueurs par la microgravité est difficilement réalisable car ils sont très peu exprimés. Cela pourrait expliquer la discordance avec l'étude de Doñas et collaborateurs.

V. Conclusion

L'ensemble de nos résultats montre que la microgravité est capable de faire apparaître un phénotype moins mature des DC caractérisé par une diminution de l'expression membranaire des marqueurs d'activation (CMHII, CD80, CD86, CD40) et des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , IP-10, IL-12 β) associé à une fonction diminuée (diminution de la survie, de la

prolifération et de la polarisation des LT CD4+ vers un profil Th1). En revanche, les DC exposées à la microgravité ne présentent pas une augmentation de l'expression des marqueurs de tolérance ou de la polarisation des LT CD4+ vers un profil Treg. Ainsi, les DC exposées à la microgravité simulée présentent un profil moins inflammatoire. Nous avons montré que la diminution de cet état pro-inflammatoire pourraient être expliquée par une altération de l'activation de NFκB en condition microgravitaire. Les études menées sur EZH2 et JMJD3 ont montré que la microgravité engendre une modification de l'expression de ces deux enzymes et il se pourrait qu'elle modifie également leur fonction. De plus, la fonction d'EZH2 ne semble pas indispensable à la différenciation des DC. Enfin, les expressions d'EZH2 et de JMJD3 sont modulées par l'activation/maturation des DC faisant d'EZH2 et JMJD3 des acteurs importants de cette activation/maturation.

Finalement, l'ensemble de ces altérations causées par la microgravité pourrait expliquer la diminution de l'efficacité de réponse des DC contre les pathogènes en condition microgravitaire (Sastry et al., 2001) et donc les troubles immunitaires observés chez près de la moitié des astronautes (Crucian et al., 2016; Mehta et al., 2014).

Objectif 2 : Étude des effets du stress hypergravitaire sur la lymphopoïèse T

I. Introduction

Les stress gravitaires rencontrés par les astronautes sont connus pour affecter le développement et l'activation des LT. Il a par exemple été constaté une diminution de la production des LT chez les astronautes après une mission spatiale de longue durée (Benjamin et al., 2016). De plus, il a été montré qu'après 35 jours passés dans l'ISS, les souris présentent une diminution du poids de leur thymus, et les analyses RNAseq ont suggéré une diminution de la prolifération des populations double négatives (Horie et al., 2019). D'autres travaux ont montré que la microgravité induit une diminution du nombre de cellules aux stades de maturation double positif et simple positif suggérant un impact de la microgravité sur la β sélection lors du développement des LT (Woods et al., 2005, 2003). Une étude menée au laboratoire a montré que l'exposition de souris à l'hypergravité pendant la gestation entraîne une modification du répertoire de chaînes β du TCR, chez les souriceaux, suggérant que les processus de formation et/ou de sélection des chaînes TCR β sont impactés par les modifications gravitaires (Ghislin et al., 2015). Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine des dérégulations du répertoire TCR β et de la lymphopoïèse T par les modifications gravitaires sont inconnus.

Diverses études ont montré que les modifications épigénétiques, et plus particulièrement les modifications des histones, participent à la régulation de ces processus (Cieslak et al., 2020; Hu et al., 2018). Les dérégulations épigénétiques induites par un stress gravitaire sont des pistes intéressantes à explorer, comme le soulignent des études en microgravité qui ont révélé une augmentation des niveaux d'H3K4me3 et d'H3K27me3 dans les cellules souches dérivées du sang humain (Gambacurta et al., 2019) et une diminution des niveaux d'H3K27me3 au niveau de promoteurs spécifiques de cellules souches mésenchymateuses humaines différenciées *in vitro* (Koaykul et al., 2019). H3K27me3 pourrait donc être affecté par le stress gravitationnel dans différents types de cellules.

L'objectif 2 de ma thèse a donc eu pour but de comprendre si une exposition à l'hypergravité (2 *xg*) pendant 3 semaines pouvait avoir un impact sur la recombinaison V(D)J en altérant la

modification post-traductionnelle de l'histone H3K27me3 et l'activité d'EZH2 chez des souris mâles adultes.

II. Résultats

1. Impacts du stress hypergravitaire sur la lymphopoïèse T

Afin d'étudier l'impact de l'hypergravité sur le développement des LT, nous avons exposé des souris mâles adultes à une hypergravité de 2 *xg* pendant 3 semaines. Nous avons, dans un premier temps, étudié la masse ainsi que le nombre de cellules thymiques après exposition à l'hypergravité. Nos résultats ont montré que la masse du thymus est augmentée par l'hypergravité (2G) par rapport aux souris contrôles (1G) (**Figure 1A de la publication en annexe 1**), bien que le nombre de cellules diminue (**Figure 1B de la publication en annexe 1**). De plus, les analyses de cytométrie en flux ont montré que la répartition des différentes sous-populations de thymocytes est similaire entre les souris 1G et 2G alors que le nombre de cellules diminue dans chacune des sous-populations de DN, DP, SP4, et SP8 (**Figure 1C, S1 et 1D de la publication en annexe 1**). Ces résultats suggèrent que l'hypergravité altère le développement des LT.

Afin de comprendre la diminution du nombre de cellules dans les différentes sous-populations, nous avons mesuré la concentration de corticostérone sérique, une hormone de stress pouvant induire l'apoptose des thymocytes (Marchetti et al., 2003). Les résultats obtenus n'ont pas montré d'augmentation de la quantité de corticostérone présente dans le sang des souris 2G par rapport aux souris 1G (**Figure S2 de la publication en annexe 1**), même si trois des neuf souris 2G présentaient un niveau de corticostérone élevé. Afin de vérifier l'effet de ce niveau élevé de corticostérone sur la répartition et le nombre de cellules des diverses sous-populations thymiques, nous avons comparé ces deux paramètres entre les souris 2G ayant un fort niveau de corticostérone et les autres. Encore une fois, aucune différence de répartition des sous-populations étudiées n'a été mise en évidence (**Figure S3A de la publication en annexe 1**). Seule une légère augmentation du nombre absolu de cellules au stade SP8 a été montrée (**Figure S3B de la publication en annexe 1**). La corticostérone ne peut donc pas expliquer la diminution du nombre de thymocytes observée chez les souris 2G.

Cette baisse du nombre de thymocytes pouvant s'expliquer par une mortalité plus importante des thymocytes chez les souris hypergravitaires, nous avons analysé le clivage de PARP1 dans les thymocytes des souris exposées ou non à l'hypergravité. Nos résultats n'ont pas montré

d'augmentation du clivage de PARP1 dans le thymus des souris 2G (**Figure S4 A,B de la publication en annexe 1**). De plus, l'étude du niveau de γ H2A.X, une modification post-traductionnelle des histones qui marque les cassures doubles brins de l'ADN, n'a pas mis en évidence de variation de cette modification entre les groupes 1G et 2G. Ces résultats suggèrent que les effets observés sur les thymocytes ne seraient pas liés à une mort cellulaire accrue. De la même manière, aucun changement du cycle cellulaire n'a été montré (**Figure S5 de la publication en annexe 1**).

Il apparaît donc que l'hypergravité altère la lymphopoïèse T et que ce phénomène semble indépendant d'une apoptose induite par les glucocorticoïdes.

2. Effets du stress hypergravitaire sur le répertoire TCR β

Comme décrit précédemment, des études menées au laboratoire ont montré que l'exposition de souris gestantes à une hypergravité de 2 xg entraîne une modification du répertoire TCR β chez les souriceaux (Ghislin et al., 2015). Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si ce répertoire est également modifié chez nos souris adultes exposées à ce niveau d'hypergravité. Pour cela, nous avons étudié l'utilisation des 11 segments V β les plus communément utilisés au cours de la recombinaison du locus TCR β . Nous avons comparé l'expression des transcrits de ces segments dans le thymus des souris 1G et 2G par PCR semi-quantitative. Le niveau d'expression des ARNm des segments V β a été normalisé par rapport à l'expression du TCR β . Sachant que la variation de l'utilisation d'un segment V β peut varier d'un animal à l'autre, nous avons calculé des index de dispersion afin d'évaluer la variation du répertoire, comme décrit dans Fonte et al. (Fonte et al., 2019). Ces index ont été utilisés pour effectuer deux types de comparaisons. Dans un premier temps, nous avons comparé les variations entre les expériences (I(inter-exp)) pour évaluer la variation normale des segments V β indépendamment du traitement. Ensuite, nous avons évalué les variations entre les conditions 1G et 2G (I(1G–2G)) pour déterminer si l'hypergravité affecte le répertoire du TCR β . Nos résultats ont montré que l'index comparant les conditions 1G et 2G est plus élevé que l'index inter-expériences, ce qui indique que le répertoire TCR β est bien modifié chez les souris exposées à un stress hypergravitaire de 2 xg (**Figure 2A de la publication en annexe 1**).

Les modifications du répertoire TCR β peuvent être liées à des modifications de la recombinaison V(D)J, qui est elle-même régulée en partie par l'état de compaction de la

chromatine. Aussi, nous nous sommes intéressés aux modifications potentielles de l'état de compaction de la chromatine induites par l'hypergravité. Pour cela, nous avons étudié, par PCR semi-quantitative, différents transcrits germinatifs, des transcrits associés à une ouverture de la chromatine. Trois transcrits germinatifs ont été détectés en utilisant cette méthode (V β 12-1, V β 13-3, V β 14) et nous avons montré une tendance pour une augmentation du transcrit germinatif V β 12-1 dans le thymus des souris 2G (**Figure 2B,C de la publication en annexe 1**). Ce résultat est en accord avec une modification de la structure chromatinienne et pourrait suggérer une modification du répertoire TCR β due à l'ouverture de la chromatine de manière spécifique dans certaines régions V β .

3. Effets du stress hypergravitaire sur H3K27me3 et l'expression d'EZH2

La compaction de la chromatine étant notamment régulée par les modifications post-traductionnelles des histones, nous avons voulu savoir si l'hypergravité pouvait impacter certaines de ces modifications. Pour cela, nous avons étudié le niveau global de quatre modifications de l'histone H3 dans le thymus des souris 1G et 2G : H3K27me3, H3K9pan-methyl, H2K4me2 et H3K9ac. Nos analyses par western blot ont montré que seul le niveau d'H3K27me3 est diminué significativement par l'exposition à l'hypergravité (**Figure 3A,B de la publication en annexe 1**).

Ce résultat nous a mené à nous intéresser à la méthyltransférase EZH2. En effet, EZH2 est l'une des deux enzymes responsables de la méthylation d'H3K27 et il est connu qu'elle intervienne au cours de la lymphopoïèse T. Nous avons donc étudié son expression dans les thymus des souris, exposées ou non à l'hypergravité, ainsi que l'expression de ses partenaires Suz12 et EED, deux protéines faisant partie avec EZH2 du complexe de modification de la chromatine PRC2. Les résultats ont montré que l'exposition au stress hypergravitaire entraîne une diminution significative de l'expression d'EZH2 dans les thymus des souris 2G (**Figure 4A,B de la publication en annexe 1**). En revanche, l'expression de Suz12 et EED n'est pas impactée par l'hypergravité (**Figure 4A,B de la publication en annexe 1**). Ces résultats suggèrent que la diminution de l'expression d'EZH2 serait à l'origine de la diminution de la triméthylation d'H3K27 dans les thymus des souris 2G

Afin de confirmer qu'EZH2 est bien responsable de la triméthylation d'H3K27 dans les thymus murins, nous avons cultivé des thymocytes avec un inhibiteur spécifique de l'activité

méthyltransférase d'EZH2 (GSK 126) pendant 16h. Nous avons ensuite mesuré le taux de triméthylation d'H3K27 par western blot. Ceux-ci ont montré une diminution de 20% du niveau d'H3K27me3 chez les thymocytes traitées avec l'inhibiteur (**Figure 4C,D de la publication en annexe 1**). Ce résultat confirme qu'EZH2 est impliqué dans la triméthylation d'H3K27 dans le thymus murin. Les altérations du taux de H3K27me3 induites par l'hypergravité pourraient donc être liées à la diminution de l'expression d'EZH2.

L'ensemble de ces résultats montre que sur les quatre modifications post-traductionnelles d'histones étudiées, seule H3K27me3 est impactée par l'hypergravité dans le thymus. De plus, la diminution d'H3K27me3 suggère une altération globale de la structure chromatinienne suite au stress hypergravitaire, qui pourrait être expliquée par une altération du niveau d'expression d'EZH2.

4. Impacts de l'hypergravité sur le niveau de triméthylation d'H3K27 au niveau des segments V β

Nous avons ensuite étudié de manière plus précise l'effet de l'exposition à l'hypergravité sur le locus TCR β , et notamment la triméthylation d'H3K27 au niveau de ce locus. Pour cela, nous avons utilisé la lignée SCIET27 (thymocytes bloqués au stade DN2 donc juste avant la recombinaison V(D)J). Nous avons exposé ces cellules à une hypergravité de 2 xg pendant 18h et avons étudié par CHIP le niveau d'H3K27me3 sur les promoteurs et les régions RSS de quatre segments V β (V β 12-1, V β 13-1, V β 13-3 et V β 14) (**Figure 5A de la publication en annexe 1**). Ces études ont montré que le niveau d'H3K27me3 est augmenté au niveau des promoteurs des segments V β 12-1, V β 13-1 et V β 14 et au niveau de la région RSS du segment V β 13-1 (**Figure 5B de la publication en annexe 1**). La triméthylation d'H3K27 étant associée à une compaction de la chromatine, ces résultats suggèrent que l'hypergravité entraîne une compaction locale de la chromatine. Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous avons étudié l'expression d'EZH2 et de ses partenaires Suz12 et EED dans la lignée SCIET27 exposée à l'hypergravité. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de l'expression d'EZH2 lorsque les cellules sont exposées à l'hypergravité mais pas de modification de l'expression de Suz12 et d'EED (**Figure 5C,D de la publication en annexe 1**). Ces résultats suggèrent qu'au sein des cellules SCIET27, l'hypergravité dérégule la triméthylation d'H3K27 spécifiquement au niveau des promoteurs et des régions RSS de certains segments V β , ce qui pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'expression protéique d'EZH2.

5. Implication d'EZH2 dans la modification post-traductionnelle d'H3K27me3 au niveau des segments V β

Afin de valider l'implication d'EZH2 dans la modification de la structure de la chromatine au niveau du locus TCR β , nous avons traité les cellules SCIET27 avec l'inhibiteur GSK126. Ce traitement a induit une diminution de 80% du taux de triméthylation d'H3K27 confirmant qu'EZH2 est la principale enzyme responsable de la méthylation d'H3K27 dans ces cellules (**Figure 6A de la publication en annexe 1**). Nous avons ensuite étudié l'impact d'une telle inhibition sur le taux de triméthylation d'H3K27 au niveau des régions promotrices et RSS des quatre segments V β étudiés précédemment. Cette expérience de CHIP a montré que l'inhibition d'EZH2 entraîne une diminution du taux d'H3K27me3 au niveau des régions RSS des segments V β 12-1, V β 13-1, V β 13-3 et V β 14, une diminution au niveau des promoteurs des segments V β 12-1 et V β 14, ainsi qu'une tendance à une diminution au niveau des promoteurs des segments V β 13-1 et V β 13-3 (**Figure 6B de la publication en annexe 1**). Ces résultats confirment qu'EZH2 est responsable de la triméthylation d'H3K27me3 au niveau du locus TCR β .

Finalement, nous avons voulu savoir si une telle dérégulation d'EZH2 et du niveau de triméthylation d'H3K27 pouvait avoir un impact sur la dérégulation de la recombinaison V(D)J. Pour cela, nous avons quantifié par PCR semi-quantitative l'expression des quatre transcrits germinatifs étudiés dans cette expérience de CHIP. Nous avons montré que l'inhibition de la fonction méthyltransférase d'EZH2, grâce à son inhibiteur spécifique GSK126, induit une augmentation de l'expression des transcrits germinatifs de V β 12-1 et V β 13-3 ainsi qu'une tendance à l'augmentation de ceux de V β 13-1 (**Figure 6C de la publication en annexe 1**). Ces résultats suggèrent que l'inhibition d'EZH2 entraîne une dérégulation de la triméthylation d'H3K27 au niveau des segments V β et que cette dérégulation est susceptible d'altérer l'expression de certains transcrits germinatifs et donc le mécanisme de recombinaison V(D)J.

III. Discussion et perspectives

Dans cette étude nous avons montré que l'exposition de souris pendant 21 jours à 2 xg entraîne une augmentation de la masse du thymus. Ce résultat est en accord avec notre précédente étude ayant montré une augmentation de la masse thymique chez les souriceaux mâles qui se sont développés à 2 xg (Ghislin et al., 2015). D'autres études ont montré une modification de la masse du thymus murin pendant les vols spatiaux mais les résultats ne sont

pas toujours concordants. Ainsi, il a été montré une diminution (Baqai et al., 2009; Horie et al., 2019), une augmentation (Pecaut et al., 2000) ou une absence de changement (Chapes et al., 1999; Congdon et al., 1996) de la masse du thymus pendant les vols spatiaux. Ces discordances pourraient être liées aux conditions expérimentales différentes rencontrées pendant les missions spatiales.

Nous avons observé que cette augmentation de la masse du thymus est associée à une diminution du nombre de thymocytes à tous les stades de développement. Cette observation est en désaccord avec Tateishi et collaborateurs qui ont observé que la masse du thymus et le nombre de thymocytes est comparable entre les souris exposés à une hypergravité de 2 *xg* ou non (Tateishi et al., 2015). Cette différence peut s'expliquer par la durée d'exposition à l'hypergravité : nous avons exposé nos souris pendant 3 semaines alors que Tateishi et collaborateurs ont exposé les leurs pendant seulement 2 semaines (Tateishi et al., 2015). Une autre étude a également montré une diminution du nombre de thymocytes en hypergravité (Horie et al., 2019). Ces auteurs ont attribué cette diminution à une apoptose médiée par une augmentation de la production de corticoïdes. Bien que trois de nos souris exposées à l'hypergravité présentaient un niveau plus élevé de corticostérone sérique, nous avons montré que, globalement, 21 jours d'exposition à l'hypergravité ne modifient pas le niveau de corticostérone sérique. Ces résultats sont comparables à ceux de Guéguinou et al. qui ont montré que l'exposition à une hypergravité de 2 *xg* pendant 21 jours n'engendre pas d'augmentation de la corticostérone sérique (Guéguinou et al., 2012). De plus, la comparaison de la répartition et du nombre de cellules dans les différents stades de développement entre nos souris présentant un niveau faible ou élevé de corticostérone a montré un profil comparable. Ces résultats suggèrent que l'effet négatif d'une exposition à une hypergravité de 2 *xg* sur le développement des thymocytes serait indépendant du niveau de glucocorticoïde sérique. Néanmoins, nous ne pouvons pas totalement exclure cette possibilité puisque nous n'avons pas quantifié les glucocorticoïdes présents dans le thymus. De plus, il se pourrait que l'hypergravité augmente la production de glucocorticoïdes de manière plus précoce, c'est-à-dire avant le 21^{ème} jour où a été faite notre analyse. Ce phénomène pourrait alors être à l'origine de l'altération du développement des thymocytes observée chez les souris 2G. Enfin, l'apoptose dans le thymus est très difficilement détectable à cause des macrophages présents

dans le thymus qui éliminent continuellement les cellules apoptotiques (Savill et al., 2002; Surh and Sprent, 1994; Yélamos et al., 2006).

Une autre hypothèse pouvant expliquer la diminution du nombre de thymocytes est un blocage du cycle cellulaire. Nous avons montré que l'hypergravité chronique ne modifie pas l'expression des transcrits de la CyclineD1, ce qui semble suggérer qu'il n'y a pas d'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, nous ne pouvons pas exclure cette possibilité puisque notre étude sur le cycle cellulaire est très succincte. Il serait intéressant de la compléter par une étude plus poussée du cycle cellulaire, notamment en analysant l'expression protéique de certaines cyclines (cycline D1, E, A, B) ou la phosphorylation de certains facteurs constituant les points de contrôle du cycle cellulaire (e.g. le facteur Rb (rétinoblastome)). De plus, nos résultats suggèrent que l'hypergravité modifie l'activité d'EZH2. Or, il a été montré à plusieurs reprises qu'EZH2 est important dans la régulation du cycle cellulaire, l'autophagie, l'apoptose et la sénescence cellulaire (Ito et al., 2018; Nutt et al., n.d.; Yao et al., 2016). Le blocage du cycle cellulaire reste donc une hypothèse pouvant expliquer la diminution du nombre de thymocytes.

Finalement, la diminution du nombre de cellules pourrait aussi être expliquée par une modification du microenvironnement thymique. Les cellules épithéliales thymiques (TEC), faisant partie du microenvironnement thymique, sont essentielles au développement des LT. Or, il a été montré que l'hypergravité est susceptible de diminuer le nombre et la fonction des TEC (Tateishi et al., 2015). Ainsi, nous pourrions imaginer que les souris exposées à l'hypergravité présentent une diminution du nombre de TEC et donc une diminution du développement des LT ce qui pourrait conduire à une diminution de leur nombre. De plus, le complexe PRC2 contenant EZH2 est nécessaire à la régulation du développement et de la fonction des TEC puisque son inactivation a été montrée comme induisant une modification de la diversité de la chaîne β du TCR aux stades SP4 et SP8 (Barthlott et al., 2021). Nous avons montré une diminution de l'expression d'EZH2 et du niveau de triméthylation d'H3K27 dans le thymus des souris exposées à l'hypergravité. Ces résultats suggèrent une réduction de l'activité du complexe PRC2 qui pourrait également être altérée dans les TEC entraînant ainsi une modification de leur développement et/ou leur activité et aboutissant à une altération de la lymphopoïèse T.

Dans la suite de notre étude, nous nous sommes intéressés aux modifications épigénétiques dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires aboutissant à l'altération de la lymphopoïèse T et de la recombinaison V(D)J. Il est connu que les modifications épigénétiques sont en partie responsables de la régulation de la recombinaison V(D)J (Gopalakrishnan et al., 2013; Guo et al., 2011; Jhunjhunwala et al., 2008; Skok et al., 2007). Notre étude sur les transcrits germinatifs suggère une ouverture de la chromatine au niveau du locus TCR β dans le thymus des souris exposées à l'hypergravité. De plus, des études ont montré que le mécanisme de modification post-traductionnelle des histones régissant l'ouverture et la fermeture de la chromatine est sensible aux changements de gravité. Il a été montré une augmentation d'H3K27me3 lorsque des cellules souches dérivées de sang humain sont soumises à la microgravité (Gambacurta et al., 2019; Koaykul et al., 2019) ainsi qu'une diminution d'H3K27me3 dans des cellules souches mésenchymateuses humaines différenciées *in vitro* en microgravité. Ainsi, une dérégulation d'H3K27me3 pourrait expliquer les modifications du répertoire TCR β que nous avons observées dans le thymus des souris 2G. Nous avons donc étudié l'impact de l'hypergravité sur la triméthylation d'H3K27me3 au niveau des promoteurs et des régions RSS de quatre segments V β dans les cellules SCIET27. Nous avons observé que l'hypergravité induit une augmentation d'H3K27me3 au niveau des promoteurs de trois segments V β étudiés ainsi que de la région RSS d'un segment V β . Cela suggère que la modification a eu lieu préférentiellement sur les régions promotrices des segments V β . Ce résultat semble être en contradiction avec notre analyse globale sur les thymocytes des souris 2G qui montre une diminution d'H3K27me3. Cependant, il est important de rappeler qu'une diminution globale à l'échelle d'un tissu n'est pas toujours le signe d'une diminution locale sur une séquence d'ADN au niveau d'un type cellulaire composant ce tissu. En effet, pour le besoin de l'étude, les ChIP ont été réalisés sur des cellules SCIET27 qui sont des thymocytes bloqués au stade DN2. Or, dans le thymus, le stade DN2 est minoritaire et l'analyse globale que nous avons faite ne peut pas être représentative du stade DN2. Ainsi, il serait intéressant, dans le futur, de compléter cette étude en menant une étude sur la distribution d'H3K27me3 le long du génome des différentes sous-populations thymiques afin de comprendre comment le profil de méthylation est modifié au cours de la lymphopoïèse T. Enfin, sachant que l'état de compaction de la chromatine est régulé par plusieurs modifications des histones formant le code histone, il serait aussi intéressant d'étudier

d'autres modifications, comme H3K4me3 qui est associé à l'ouverture de la chromatine, contrairement à H3K27me3.

La méthylation d'H3K27 est médiée par le complexe PRC2 *via* EZH2 ou son homologue EZH1. La déméthylation est quant à elle le résultat de l'activité des déméthylases JMJD3 et UTX (Kooistra and Helin, 2012). Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur EZH2 puisqu'il est connu qu'il est important pour le développement des LT (Mochizuki-Kashio et al., 2011; Su et al., 2005) et que c'est le principal acteur de la méthylation d'H3K27 dans les cellules DN (Su et al., 2005) comme l'a confirmé notre traitement des cellules DN2 SCIET27 avec un inhibiteur spécifique d'EZH2. Bien que l'étude de Su et al. ne mette pas en évidence d'implication d'EZH2 dans la recombinaison V(D)J (Su et al., 2005), nos résultats suggèrent une implication directe d'EZH2 dans la restructuration de la chromatine au niveau du locus TCR β .

Pour conclure, cette étude a mis en évidence pour la première fois que le niveau de triméthylation H3K27me3 est diminué dans les thymocytes de souris exposées à l'hypergravité et que cette modification peut probablement modifier la structure chromatinienne au niveau du locus TCR β . Ce phénomène pourrait ainsi expliquer la modification du répertoire TCR β observée chez les souris exposées à l'hypergravité. De plus, nous avons montré pour la première fois qu'EZH2 est directement impliqué dans la régulation d'H3K27me3 au niveau du locus TCR β . Dans le futur, il serait intéressant d'étudier plus largement cette régulation épigénétique dans différentes sous-populations thymiques pour mieux comprendre les altérations de la lymphopoïèse T en réponse aux altérations gravitaires, notamment en microgravité simulée ou pendant un vol spatial.

Conclusion générale et perspectives

Au cours des dernières années, la préparation de vols à destination de Mars a amené les agences spatiales à organiser des missions dans l'espace beaucoup plus fréquemment et sur des durées plus longues. Ceci n'est pas sans conséquence pour les astronautes car les conditions extrêmes qu'ils rencontrent pendant ces missions, comme les stress socio-environnementaux (e.g. confinement, isolement, bruit), les modifications du cycle circadien, les radiations ou encore les changements gravitaires (hypergravité, microgravité) ont un effet délétère sur leur santé. Parmi ces désordres, il a été montré que la moitié des astronautes ayant séjourné dans l'espace présentent des troubles immunitaires (Crucian et al., 2016). Cette altération du système immunitaire est problématique puisqu'elle entraîne la réactivation de certains virus latents tels que le virus de l'herpès, de la varicelle ou du cytomégalovirus (Mehta et al., 2017, 2014) ou encore des infections (Crucian et al., 2016). Ainsi, il est essentiel de caractériser les altérations du système immunitaire induites par les vols spatiaux ainsi que les mécanismes qui y sont associés. Ces études ont pour but, à terme, de développer des contremesures permettant de limiter les effets de ces stress.

De nombreux auteurs ont contribué à la compréhension des altérations du système immunitaire observées lors des missions spatiales. Il a ainsi été montré que, d'une manière générale, les stress associées aux vols spatiaux affectent l'ensemble des cellules immunitaires. On observe une redistribution des cellules dans l'organisme, des défauts de développement de l'ensemble des cellules ainsi qu'une diminution de leur activation et de leurs fonctions (Baqai et al., 2009; Frippiat et al., 2016; Lewis et al., 1998). Cependant, ces études restent incomplètes et bien qu'il est connu que les vols spatiaux affectent le développement des LT (Benjamin et al., 2016), les mécanismes moléculaires qui en sont responsables ne sont pas entièrement connus. De la même manière, bien que les cellules dendritiques soient au centre de la réponse immunitaire et permettent son orchestration, *via* la polarisation des LT CD4+, très peu d'études mettent en avant l'impact des vols spatiaux sur celles-ci. Il a été montré que la microgravité simulée altère la différenciation des DC (Low et al., 2018; Monici et al., 2007) ou encore que les DC dérivées de monocytes, présents dans le sang des astronautes après un vol spatial, présentent un défaut d'activation/maturation (Monici et al., 2007). Cela est associé à une diminution de leurs fonctions comme la phagocytose et la production de cytokines (Savary et al., 2001). Cependant, ces altérations du phénotype et de la fonction des DC suite

aux vols spatiaux sont peu caractérisées et les mécanismes moléculaires qui permettent de les expliquer sont, tout comme pour les LT, inconnus. Toutes ces observations nous ont menés à nous intéresser plus en détail aux effets des vols spatiaux sur les LT et les DC.

De par les contraintes techniques, la rareté des missions spatiales, leur coût très élevé ou encore le faible nombre d'échantillons disponibles, il est difficile de réaliser des expérimentations en conditions spatiales. De plus, les études réalisées dans l'espace sont multifactorielles et combinent souvent les effets des modifications gravitaires, des radiations, et des stress socio-environnementaux. Il n'est donc pas possible de discriminer quel est l'effet d'un de ces paramètres sur le système immunitaire. Pour pallier cela, il existe des modèles terrestres permettant d'étudier l'effet de ces stress de manière indépendante et pouvant s'adapter aux modèles d'études (Crucian et al., 2014).

Dans ce contexte, nous avons voulu étudier l'effet de la microgravité simulée sur le phénotype et la fonction de DC murines cultivées *in vitro* ainsi que les mécanismes moléculaires qui y sont associés. Nous avons montré que la microgravité diminue le phénotype d'activation/maturation des DC et que cela est associé à une diminution de leur capacité à stimuler la survie, la prolifération, et la polarisation des LT CD4+ vers un profil Th1. Ainsi, nos résultats suggèrent que la microgravité diminue le profil pro-inflammatoire des DC. Nous avons également montré que ces altérations pourraient être liées à une dérégulation de la voie NFκB qui est importante dans l'activation des DC mais que les MAPK ne semblent pas être impliquées. Ensuite, sachant que les modifications épigénétiques sont très importantes pour expliquer certaines réponses cellulaires au stress, nous nous sommes intéressés à celles-ci (Gambacurta et al., 2019; Koaykul et al., 2019). Nos études ont montré que le taux de triméthylation d'H3K27 ainsi que l'expression des enzymes responsables de cette triméthylation (EZH2, JMJD3) est finement régulée pendant l'activation des DC et altérée par la microgravité. Ces modifications pourraient donc également expliquer comment la microgravité impacte le phénotype et la fonction des DC.

D'autre part, nous avons étudié l'effet de l'exposition de souris à un stress hypergravitaire sur la lymphopoïèse T et plus particulièrement sur le processus de recombinaison V(D)J. Grâce à cette étude, nous avons montré que la lymphopoïèse T est altérée lorsque des souris sont exposées à une hypergravité de 2 xg. L'hypergravité modifie le répertoire TCRβ suggérant une modification de la recombinaison V(D)J. Étant donné qu'il est connu que les modifications des

histones participent à la régulation de ce processus de recombinaison (Cieslak et al., 2020; Hu et al., 2018) et que les stress gravitaires peuvent induire des dérégulations épigénétiques (Gambacurta et al., 2019; Koaykul et al., 2019), nous nous sommes intéressé au rôle de la triméthylation H3K27me3 dans cette altération de la recombinaison V(D)J par l'hypergravité. Nous avons montré qu'H3K27me3 est diminuée par l'hypergravité au niveau du locus TCR β ce qui pourrait aboutir à un remodelage local de la chromatine et donc à une dérégulation du processus de recombinaison V(D)J. Finalement, nous avons fait le lien entre la triméthylation d'H3K27 au niveau du locus TCR β et la fonction d'EZH2. Étant donné que l'hypergravité diminue l'expression d'EZH2 dans notre modèle, il se pourrait que cette observation explique les altérations d'H3K27me3 au niveau du locus TCR β .

L'ensemble des résultats obtenus dans les deux objectifs de ma thèse suggèrent que les modifications gravitaires impactent d'une part le développement des LT et d'autre part le phénotype et la fonction des DC. Un tel impact sur ces deux types de cellules immunitaires, associé aux altérations des autres cellules, pourrait expliquer la perte d'efficacité du système immunitaire chez les astronautes pendant les vols spatiaux (Crucian et al., 2018).

A l'avenir, ces données obtenues *in vitro* pourront être complétées par des études *in vivo* en utilisant le modèle d'hypergravité ou le modèle HU. Ces modèles permettront non seulement une étude sur les DC mais également d'évaluer les répercussions sur la réponse immunitaire médiée par les LT.

En ce qui concerne les LT, nous avons utilisé des souris soumises à un stress hypergravitaire pour montrer qu'un changement de la force gravitaire modifie la lymphopoïèse T et le répertoire TCR β , nous avons aussi utilisé une lignée de thymocytes bloqués au stade DN2 pour étudier la triméthylation d'H3K27 au niveau du locus TCR β . Dans le futur, il serait intéressant de compléter ces études en étudiant plus largement les autres sous-populations thymiques. De plus, nous pourrions étudier l'effet de la microgravité (modèle HU) ou d'un véritable vol spatial.

Ces études réalisées sur les DC et les LT ont toutes les deux montré l'importance de la triméthylation d'H3K27 dans les processus altérés par les modifications gravitaires. En effet, nous avons montré qu'H3K27me3 est important pour l'activation/maturation des DC et qu'il est impacté par la microgravité. Il se pourrait donc qu'il intervienne dans les altérations du

phénotype et de la fonction des DC soumises à la microgravité. De plus, nous avons montré qu'il est affecté par l'hypergravité dans les thymocytes en cours de maturation et que ce phénomène pourrait expliquer la modification du répertoire TCR β observé en hypergravité. Il serait donc essentiel d'approfondir cette partie de l'étude en étudiant notamment la distribution d'H3K27me3 le long du génome de DC soumises à la microgravité ou de LT soumis à l'hypergravité. Cette modification de l'histone H3 étant une marque répressive de la transcription, cette étude permettrait de mieux comprendre les gènes actifs et inactifs ainsi que de faire le lien entre les modifications gravitaires et l'activation ou la répression de certains gènes. De plus, les modifications post-traductionnelles des histones sont directement liées à l'état compacté ou décompacté de la chromatine. Ainsi, cette étude permettrait une meilleure compréhension de la modification de la structure chromatinienne par les modifications gravitaires. Enfin, il faut savoir que l'état de compaction de la chromatine est régulé par plusieurs modifications des histones formant le code histone. Il serait donc aussi intéressant d'étudier d'autres modifications comme H3K4me3, qui est associée à l'ouverture de la chromatine contrairement à H3K27me3, et qui a également été montrée comme étant dérégulée par la microgravité dans les cellules souches humaines (Gambacurta et al., 2019).

Finalement, cette étude possédait un double enjeu. D'une part, elle a permis de mieux comprendre les conséquences des modifications gravitaires sur les DC et les LT et donc de mieux caractériser les altérations du système immunitaire rencontrées lors des vols spatiaux. D'autre part, elle a permis de découvrir de nouveaux modes de régulation des cellules immunitaires. Enfin, il est important de rappeler que des études comme la nôtre, menées sur les effets des stress rencontrés lors des vols spatiaux, ont également un intérêt sociétal. En effet, des études ont montré que les altérations du système immunitaire rencontrées lors des vols spatiaux sont comparables à celles observées lors du vieillissement (Bauer, 2005; Bauer et al., 2009). En effet, chez la souris soumise au modèle HU, il a été observé une modification de la structure osseuse ainsi qu'une altération de la lymphopoïèse B qui est comparable à celle observée lors du vieillissement. Ainsi, les modèles d'études tel que le modèle HU sont également considérés comme des modèles de vieillissement prématuré. Ces études pourraient donc, en plus d'améliorer la santé des astronautes permettre de comprendre et de développer des stratégies visant à ralentir le vieillissement du système immunitaire.

Annexe 1

Publication : Chronic Hypergravity Induces a Modification of Histone H3 Lysine 27
Trimethylation at TCR β Locus in Murine Thymocytes

G. Calcagno, N. Ouzren, S. Kaminski, S. Ghislin and J.-P. Fripiat



Article

Chronic Hypergravity Induces a Modification of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation at TCR β Locus in Murine Thymocytes

Gaetano Calcagno , Nassima Ouzren, Sandra Kaminski, Stéphanie Ghislin ^{*,†} and Jean-Pol Frippiat ^{*,†}

Stress, Immunity, Pathogens Laboratory, SIMPA, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; gaetano.calcagno@univ-lorraine.fr (G.C.); nassima.ouzren-zarhloul@univ-lorraine.fr (N.O.); sandra.kaminski@univ-lorraine.fr (S.K.)

* Correspondence: stephanie.ghislin@univ-lorraine.fr (S.G.); jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr (J.-P.F.)

† Stéphanie Ghislin and Jean-Pol Frippiat jointly supervised this work.

Abstract: Gravity changes are major stressors encountered during spaceflight that affect the immune system. We previously evidenced that hypergravity exposure during gestation affects the TCR β repertoire of newborn pups. To identify the mechanisms underlying this observation, we studied post-translational histone modifications. We first showed that among the four studied post-translational histone H3 modifications, only lysine 27 trimethylation (H3K27me3) is downregulated in the thymus of mice exposed to $2 \times g$ for 21 days. We then asked whether the TCR β locus chromatin structure is altered by hypergravity exposure. ChIP studies performed on four V β segments of the murine double-negative SCIET27 thymic cell line, which corresponds to the last maturation stage before V(D)J recombination, revealed increases in H3K27me3 after $2 \times g$ exposure. Finally, we evaluated the implication for the EZH2 methyltransferase in the regulation of the H3K27me3 level at these V β segments by treating SCIET27 cells with the GSK126-specific inhibitor. These experiments showed that the downregulation of H3K27me3 contributes to the regulation of the V β germline transcript expression that precedes V(D)J recombination. These data show that modifications of H3K27me3 at the TCR β locus likely contribute to an explanation of why the TCR repertoire is affected by gravity changes and imply, for the first time, EZH2 in the regulation of the TCR β locus chromatin structure.

Keywords: hypergravity; stress; T lymphopoiesis; V(D)J recombination; epigenetic; EZH2



Citation: Calcagno, G.; Ouzren, N.; Kaminski, S.; Ghislin, S.; Frippiat, J.-P. Chronic Hypergravity Induces a Modification of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation at TCR β Locus in Murine Thymocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7133. <https://doi.org/10.3390/ijms23137133>

Academic Editors: John Lawler and Khaled Kamal

Received: 2 June 2022

Accepted: 25 June 2022

Published: 27 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

During T lymphopoiesis, cells go through highly regulated differentiation steps that lead to the production of functional CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Four main differentiation stages can be identified using specific cell surface markers: the early double negative (DN) (CD4⁻CD8⁻), double positive (DP) (CD4⁺CD8⁺), single positive CD4 (SP4) (CD4⁺CD8⁻CD3⁺TCR⁺) and single positive CD8 (SP8) (CD4⁻CD8⁺CD3⁺TCR⁺) stages. The diversity of T-cell receptors (TCRs), composed of one heavy chain (TCR β) and one light chain (TCR α), is generated via the V(D)J recombination mechanism occurring at specific differentiation stages between the DN2 and DN3 stages for TCR β at the DP stage for TCR β . This V(D)J recombination process associates a variable (V) and a joining (J) gene segment to create an α chain gene and a variable (V), a diversity (D) and a joining (J) gene segment to create a β chain gene. V(D)J recombination relies on recombination signal sequences (RSS) located at the 3' end of V, on both sides of D and at the 5' end of the J segments, as well as on specific proteins (e.g., recombination-activating gene (RAG) proteins). Before V(D)J recombination, unrearranged V gene segments and J-C regions of the TCR loci are transcribed in a stage-specific manner [1–4]. Germline transcription of these loci, which is indicative of chromatin opening, is required for V(D)J recombination [3].

In addition to germline transcription, epigenetic and, more precisely, posttranslational histone modifications contribute to T lymphopoiesis [5,6] and V(D)J recombination [7].

Indeed, the histone methyltransferase PRC2 complex (Polycomb Repressive Complex 2), composed of EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog), Suz12 (Suppressor of Zeste-12), EED (Embryonic Ectoderm Development) and RbAp46/48 (Retinoblastoma protein (Rb)-Associated protein (Ap)), is essential for T lymphopoiesis [8,9]. This complex, via EZH2 activity, adds between one to three methyl groups to the lysine 27 of histone H3 (H3K27me1–3). A specific knockdown of EZH2 in the T lineage induces a blockage of T-cell differentiation at the DN3 stage, corresponding to the β -selection checkpoint and the absence of mature T-cells [8,9]. At this stage, EZH2 methylates the *Cdkn2a* promoter to prevent p53 stabilization [10]. Different histone posttranslational modifications that participate in chromatin structure regulation and DNA boucle formation are also required to allow V(D)J recombination [11–14]. Indeed, Gopalakrishnan and colleagues observed correlations between the recombination efficiency, histone acetylation and H3K4 methylation [11]. However, no comprehensive data are available about the contribution of EZH2 and H3K27me3 to the regulation of TCR β locus recombination under physiological or extreme conditions such as spaceflight.

During space missions, astronauts are exposed to different types of stresses, i.e., microgravity during flight, hypergravity at launch and landing, radiation, confinement, isolation, sleep deprivation and disrupted circadian rhythm, which can negatively affect their health [15,16]. Indeed, medical data collected from 46 astronauts who spent 6 months onboard the International Space Station (ISS) revealed that 46% of them presented immunological problems [17]. Benjamin et al. [18] evidenced a decrease in T-cell production in astronauts after a long-term space mission. Despite this important observation, studies about the effects of spaceflight on T-cell differentiation are rare [18–23]. Due to the cost and limited availability of spaceflight missions, various ground-based models have been developed to study the mechanisms underlying deleterious effects on the immune system. Among them, gravity change is widely studied, either by reducing gravity constraints by means of head down tilt bed rest for humans [24] and an anti-orthostatic suspension in rodents [25] or by increasing the gravity level through chronic centrifugation [26]. Even though they act mechanically in a opposite way, reducing both the gravity constraints and chronic centrifugation simulates many of the chronic stressors inherent to spaceflight experiments, i.e., exposure to a novel environment, changes in limbs loads, cephalic fluid distribution shifts and orthostatic intolerance [27]. Thus, using rotors to expose animals to different levels of hypergravity is an efficient means of understanding how altered gravity affects physiological functions. Furthermore, different studies demonstrated that micro- and hypergravity influence the shape of cells, initiate cytoskeleton reorganization and influence cell motility [28]. Concerning T-cell development, Woods et al. [19,20] showed that simulated microgravity impacts β -selection. Our team demonstrated that the repertoire of TCR β chains is modified when animals develop in hypergravity ($2\times g$) [21] or under environmental conditions mimicking the chronic socioenvironmental stressors encountered by astronauts [22], suggesting that TCR β chain formation and/or selection processes are impacted by both types of stressors. Moreover, it was shown that, after 35 days spent in the ISS, mice presented a reduced thymic weight, and RNAseq analyses suggested lower proliferation capabilities of double-negative populations [23]. However, the molecular mechanisms underlying the TCR β repertoire and T lymphopoiesis deregulations under spaceflight conditions are unknown. In this context, epigenetic deregulations in response to gravitational stress are interesting avenues to explore, as highlighted by recent studies that revealed increased H3K4me3 and H3K27me3 levels in microgravity-exposed human blood-derived stem cells [29] and lower H3K27me3 levels at specific promoters in human mesenchymal stem cells differentiated in vitro in microgravity [30]. These two studies suggest that H3K27me3 could be affected by gravitational stress in different cell types.

In this study, we wondered whether gravitational stress could impact V(D)J recombination by altering the H3K27me3 histone posttranslational modification and EZH2 methyltransferase activity. To this end, we exposed adult male mice to hypergravity ($2\times g$) for 3 weeks to allow a comparison with the only previous study to have analyzed the effects of gravity change ($2\times g$ during 3 weeks) on the TCR β chain repertoire and V(D)J recombina-

tion [21]. The 21-day duration was also defined by a similarity with the average duration (~6 months) of a mission in the ISS. Indeed, 6 months of human life would correspond to ~21 days in mice [31]. Our data revealed a global decrease in the thymic H3K27me3 level. However, local analysis revealed an increase in H3K27me3 on some specific regions of four V β segments in the murine double-negative SCIET27 thymic cell line exposed to 2 \times g gravity. Moreover, we demonstrated that EZH2 could contribute to V(D)J recombination regulation. Indeed, we showed that EZH2 inhibition in the SCIET27 cell line modified the expression of V β germline transcripts and that these changes correlated with a decrease in the H3K27 trimethylation on 5' and 3' ends of affected V β segments.

2. Results

2.1. Hypergravity Impacts T Lymphopoiesis in Adult Mice

To evaluate the impact of hypergravity on T-cell development, we exposed adult male mice to 2 \times g for 3 weeks and then analyzed the mass and cellularity of their thymus. We observed that thymus mass slightly increased in hypergravity mice (Figure 1A), but its cellularity decreased (Figure 1B). Flow cytometry analyses did not reveal modification of the thymocyte subpopulation distribution; the percentages of the DN, DP, SP4 and SP8 were similar in 1G and in 2G mice (Figure 1C, Supplementary Figure S1). However, absolute cell numbers of the four subpopulations studied here decreased in the thymus of 2G mice (Figure 1D). These data suggest a potential global negative effect of hypergravity on T-cell development.

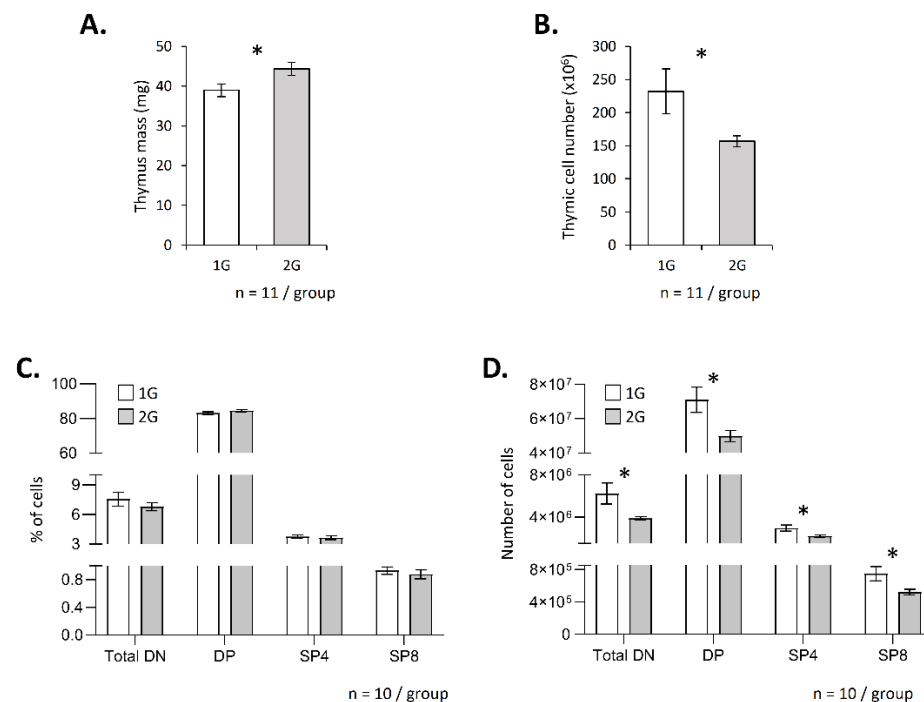


Figure 1. Hypergravity affects T lymphopoiesis. Thymus mass (A) and thymic cell number (B) in adult mice exposed to 2 \times g hypergravity for three weeks. (C,D) Analysis of T lymphopoiesis by flow cytometry. T-cell subpopulations were identified using CD4, CD8, CD3 and TCR staining. For each mouse, staining was done in duplicate, and mean was calculated. (C) Percentage of each subpopulation. (D) Absolute number of cells in each subpopulation. Data are the mean \pm SEM of 11 (A,B) or 10 mice (C,D) per group. Mann–Whitney or *t*-tests were used to reveal statistically significant differences. * $p < 0.05$.

In search of an explanation to these decreases in the absolute cell number, we quantified serum corticosterone, a major stress hormone known to induce thymocyte apoptosis. No significant increase in circulating corticosterone was observed in 2G mice (Supplementary

Figure S2). Most 2G mice had a corticosterone concentration similar to that observed in the 1G mice, though three 2G mice did deviate from the 1G mice. To determine the impact of the higher corticosterone concentration observed in these three animals, we compared the T-cell phenotypes of 2G mice with a high corticosterone concentration to the phenotypes observed in 2G mice with normal corticosterone levels. As shown in Supplementary Figure S3, we observed no significant difference between the two groups when analyzing cell percentages and only a slight increase in the SP8 when analyzing absolute cell numbers. Thus, changes in thymocyte subpopulations cannot be attributed to an increase in corticosterone. We also evaluated global apoptosis by studying the PARP1 cleavage. As shown in Supplementary Figure S4A,B, no increase in the PARP1 cleavage was observed in the 2G mice, suggesting no effect on thymocyte cell death. This observation was supported by measurement of the γ H2A.X level, which is a marker of DNA double-strand breaks. As shown in Supplementary Figure S4C,D, no significant variation was detected. Finally, we wondered whether alterations in T lymphopoiesis could be due to changes in cell proliferation. To address this question, we performed an analysis of Cyclin D1 mRNA expression in thymocytes from eight mice exposed to either $1\times g$ or $2\times g$ gravity. As shown in Supplementary Figure S5, we did not detect any variation in its expression, suggesting an absence of cell cycle modification. Taken together, these results suggest that thymocyte development is negatively impacted by hypergravity and that this negative impact is independent of glucocorticoid-induced apoptosis.

2.2. Hypergravity Affects the TCR β Repertoire of Adult Mice

Since we previously showed that the TCR β repertoire of pups developed under $2\times g$ hypergravity conditions is altered [21], we checked that this repertoire is also affected when adult mice are exposed to this level of hypergravity. To this end, and to avoid performing a lengthy and thorough description of their repertoire by NGS sequencing, which is not the scope of this paper, we checked that the use of the 11 most common V β segments is affected in 2G mice by assessing, using semiquantitative PCR, the V β mRNA expression that was normalized to the total TCR β mRNA. This normalization indicates an abundance of V β segments among TCR β mRNAs. Since variation in the V β segment usage can be animal-dependent, we calculated dispersion indexes to assess repertoire variation, as described in Fonte et al. [22]. These indexes were used to perform two types of comparisons. First, we compared variations between the experiments (I(inter-exp)) to evaluate the normal variation of the V β segments independently of treatment. Second, we evaluated variations between the 1G and 2G conditions (I(1G–2G)) to determine whether hypergravity affects the TCR β repertoire. Figure 2A shows that the indexes comparing the 1G and 2G repertoires, I(1G–2G), were significantly higher than the interexperiment indexes, I(inter-exp), which indicates that 2G exposure also modifies the TCR β repertoire in adult mice.

Knowing that chromatin compaction contributes to the regulation of V(D)J recombination, we then asked whether chromatin compaction is changed under hypergravity exposure. To address this question, we quantified, by semi-quantitative PCR, some germline transcripts that are associated with chromatin opening. Three germline transcripts were detected among the eight that were tested. We evidenced a trend ($p = 0.0587$) toward an increase in V β 12-1 germline transcripts in the thymus of the 2G mice (Figure 2B,C). This increase is in accordance with a modification of the chromatin structure and could suggest a modification of the repertoire due to chromatin opening at the level of specific V β gene segments.

2.3. Hypergravity Affects Tri-Methylation of Histone H3 Lysine 27 and EZH2 Level

As chromatin compaction is notably regulated by histone post-translational modifications, which contribute to T-cell development regulation [32] and V(D)J recombination [11–14], we wondered if hypergravity could impact some of these modifications. To address this question, global levels of four histone H3 modifications were evaluated by Western blotting.

We targeted two methylations associated with chromatin closing (H3K27me3 and H3K9 pan-methylated) and two modifications associated with chromatin opening (H3K4me2 and H3K9ac). As shown in Figure 3, only H3K27me3 was significantly reduced (−20%) in the thymus of 2G mice.

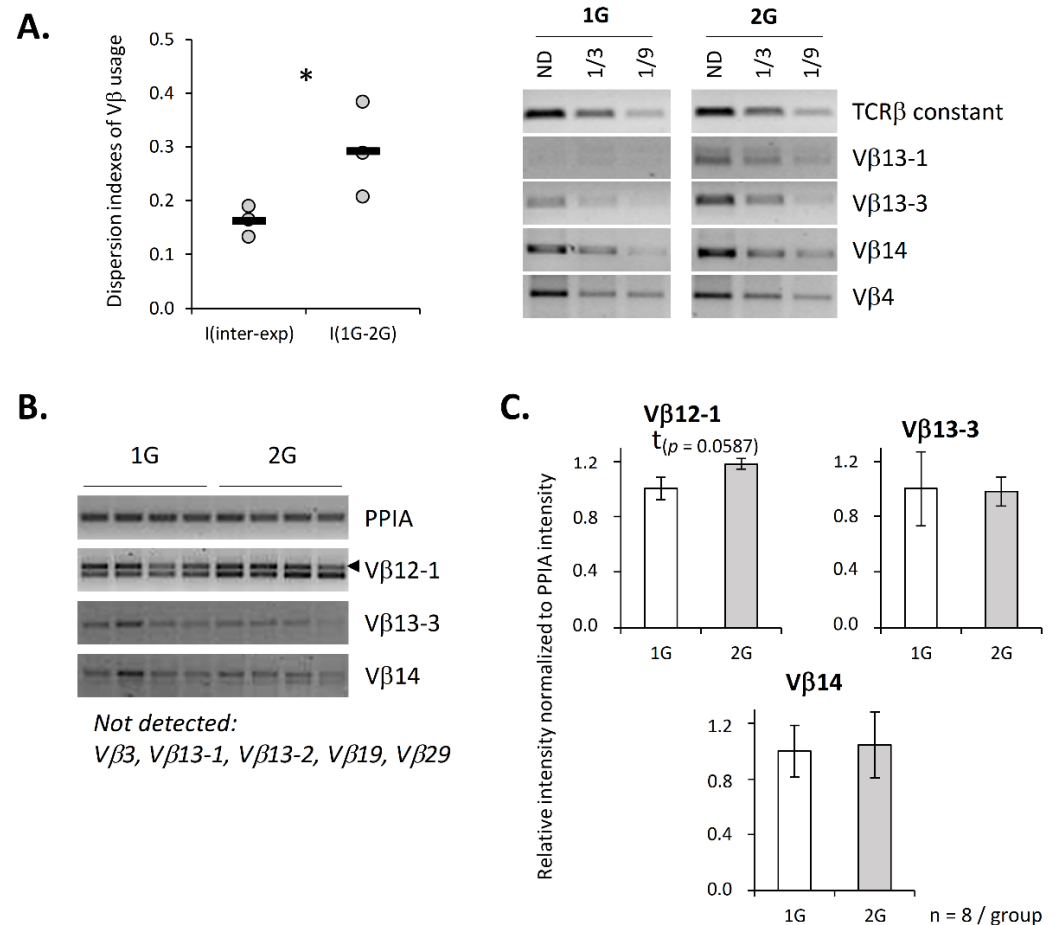


Figure 2. Hypergravity affects Vβ segments' usage and germline transcripts. (A) Vβ segments' expression was evaluated by semiquantitative PCR. Each experiment was performed using a pool of mRNA from 8 to 11 mice. The relative intensity for each of the 11 studied Vβ segments was normalized over TCRβ constant region amplification. The right panel presents the Vβ segments' amplification results from one representative experiment out of three. Then, dispersion indexes were calculated to evaluate variation between experiments (I(inter-exp), used as reference) and to evaluate variation between 1G and 2G conditions in each experiment (I(1G-2G)). The graphic (left panel) presents dispersion indexes calculated for each experiment (dot) and the mean of three independent experiments (black line). ND = not diluted. (B,C) Expression of Vβ germline transcripts evaluated by semiquantitative PCR. (B) Example of amplification observed for four mice in each group. (C) Histograms presenting the relative intensity of Vβ germline transcripts amplification normalized to PPIA intensity. A total of 8 Vβ germline transcripts were tested, and only four were detected under our conditions. Data are mean ± SEM of eight mice per group. Mann–Whitney tests were used to reveal statistically significant differences. * $p < 0.05$, t indicates a tendency.

Knowing that the methyltransferase EZH2 is essential for T lymphopoiesis and that it is one of the two enzymes responsible for H3K27 methylation, we then asked whether its thymic expression is altered under hypergravity. As shown in Figure 4A,B, the EZH2 level was significantly decreased in the thymus of 2G mice. As EZH2 is part of the PRC2 complex, we also evaluated the level of its partners Suz12 and EED. Interestingly, their levels were not affected (Figure 4A,B). These observations suggest that the H3K27me3 decrease was a consequence of the EZH2 protein level decrease.

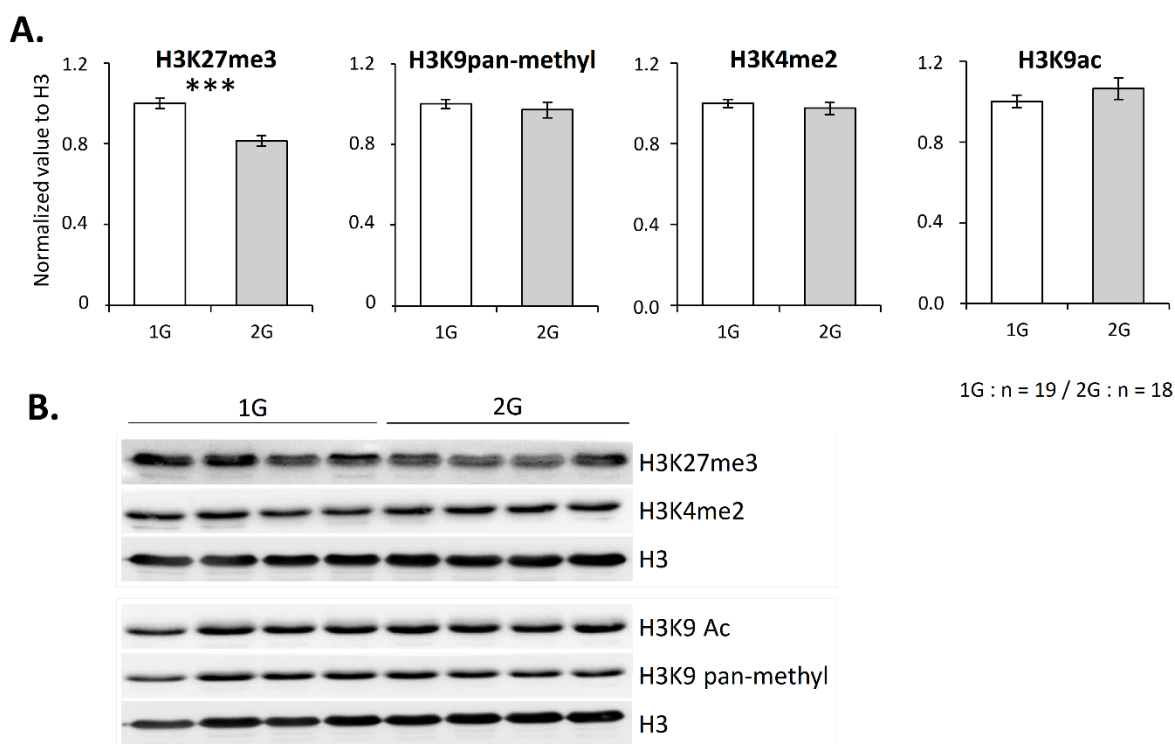


Figure 3. H3K27 trimethylation level is reduced in the thymus after 3 weeks spent at 2G. **(A,B)** H3 lysine 27 trimethylation, global H3 lysine 9 monomethylation, dimethylation or trimethylation (named panmethylation), H3 lysine 4 di-methylation and H3 lysine 9 acetylation evaluated by Western blotting. **(A)** H3-corresponding lysine methylation or acetylation relative expression normalized to H3. **(B)** Representative Western blots obtained with four mice in each group. Data are mean \pm SEM of 19 or 18 mice per group. Mann–Whitney or *t*-tests were used to reveal statistically significant differences. *** $p < 0.001$.

However, because few data exist concerning the contribution of EZH2 to H3K27methylation in the thymus, we wished to ensure that EZH2 is involved in this process. To this end, we treated thymocytes overnight with GSK126, which specifically inhibits EZH2 activity, and then assessed the level of H3K27me3 by Western blotting. As shown in Figure 4C,D, GSK126 induced a decrease in the H3K27me3 level (–20%). This result confirms that EZH2 participates in H3K27 methylation in the thymus, thus supporting the fact that 2G-induced alterations in H3K27me3 could be due to a modification in the EZH2 level.

Altogether, these results show that only some post-translational histone modifications are globally affected by hypergravity in the thymus. Furthermore, the decrease in H3K27me3 suggests a global alteration in the thymocytes' chromatin structure in response to hypergravity, which could be explained by an alteration in the EZH2 level.

2.4. Hypergravity Modifies H3K27me3 Level along V β Segments in the DN2 SCIET27 Cell Line

We then analyzed more precisely the consequence of hypergravity on the TCR β locus. To this end, we exposed the murine DN2 SCIET27 cell line to $2\times g$ during 18 h and performed ChIP experiments to evaluate the H3K27me3 level on the promoter and RSS regions of four V β segments (V β 12-1, V β 13-1, V β 13-3 and V β 14) (Figure 5A). This cell line was chosen because it is the last maturation stage before V(D)J recombination. Our results show that the H3K27me3 level was increased at the promoter of V β 12-1, V β 13-1 and V β 14 and at the RSS of V β 13-1 segments (Figure 5B), suggesting that hypergravity induced the local chromatin compaction. Since we observed a correlation between the EZH2 and H3K27me3 levels in the thymus from 2G mice (see above), we also evaluated the EZH2 level in SCIET27 exposed to $2\times g$. As shown in Figure 5C,D, EZH2 significantly increased in the $2\times g$ condition, while no variations for Suz12 and EED were detected. However, in SCIET27, no global variation for H3K27 was detected (Supplementary Figure S6). Altogether, these

results suggest that the methylation of H3K27 was locally deregulated in the SCIET27 cells exposed to $2\times g$ hypergravity, notably at the promoter of the $V\beta$ segments, which could be due to an increase in the EZH2 protein expression.

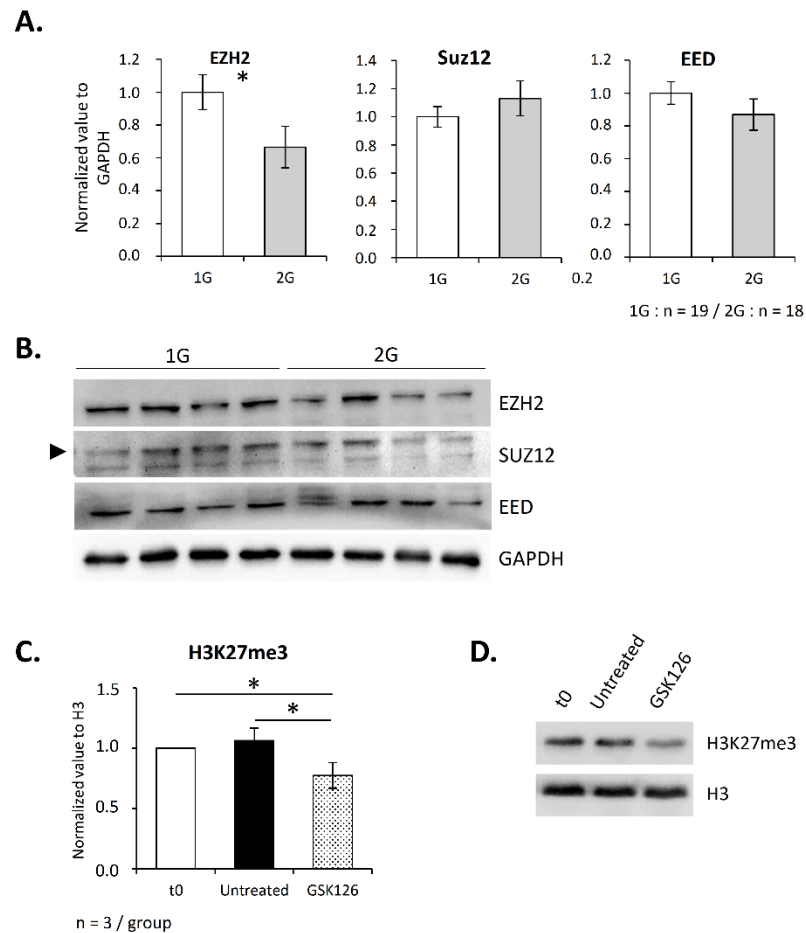


Figure 4. EZH2 is downregulated in the thymus after three weeks spent at $2\times g$ and regulates H3K27 methylation in thymocytes. (A,B) Expression of PRC2 components (EZH2, Suz12 and EED) studied by Western blotting. (A) Relative expression of EZH2, Suz12 and EED normalized to GAPDH. (B) Representative Western blots obtained with four mice in each group. Arrow indicates Suz12 protein. (C,D) To evaluate the contribution of EZH2 activity to the H3K27me3 level in the thymus, thymocytes were exposed, or not, to the specific inhibitor GSK126 at a concentration of $2\ \mu\text{M}$ for 10 h, and histones were extracted to perform Western blots. Here, 't0' indicates H3K27me3 level in thymic cells before treatment. (C) Histogram presenting the relative expression of H3K27me3 normalized to H3. (D) Western blot representative of three independent experiments. Data are mean \pm SD of three independent experiments. ANOVA was used to reveal statistically significant differences. * $p < 0.05$.

2.5. EZH2 Inhibition Alters $V\beta$ Germline Expression via a Decrease in H3K27me3 in SCIET27 Cells

To ensure that EZH2 contributes to chromatin structure regulation at the TCR β locus, the SCIET27 cell line was treated with the GSK126 inhibitor. This treatment induced an 80% decrease in the H3K27me3 level (Figure 6A), confirming that EZH2 is the main actor in H3K27 methylation in these cells. Next, ChIP experiments were performed, and the H3K27me3 level was evaluated at the same DNA regions as in Figure 5. Again, we detected the presence of H3K27me3 at all four studied $V\beta$ segments. Comparison of untreated and treated cells showed a decrease in the H3K27 trimethylation on the RSS regions of the $V\beta$ 12-1, $V\beta$ 13-1 $V\beta$ 13-3 and $V\beta$ 14 segments, a significant decrease on the promoter regions of $V\beta$ 12-1 and $V\beta$ 14 and trends for a decrease on the promoter regions of the $V\beta$ 13-1 and $V\beta$ 13-3 segments ($p = 0.0538$ and 0.063 , respectively) (Figure 6B). We then asked whether EZH2 contributes to the V(D)J recombination process. To this end, we analyzed

the expression of the four Vβ germline transcripts studied in the ChIP experiments. Our results indicate that EZH2's inhibition induced a significant increase in Vβ12-1 and Vβ13-3 germline transcripts and a trend ($p = 0.0577$) toward an increase in Vβ13-1 germline transcripts (Figure 6C). Note that Vβ14 germline transcripts could not be detected in this cell line.

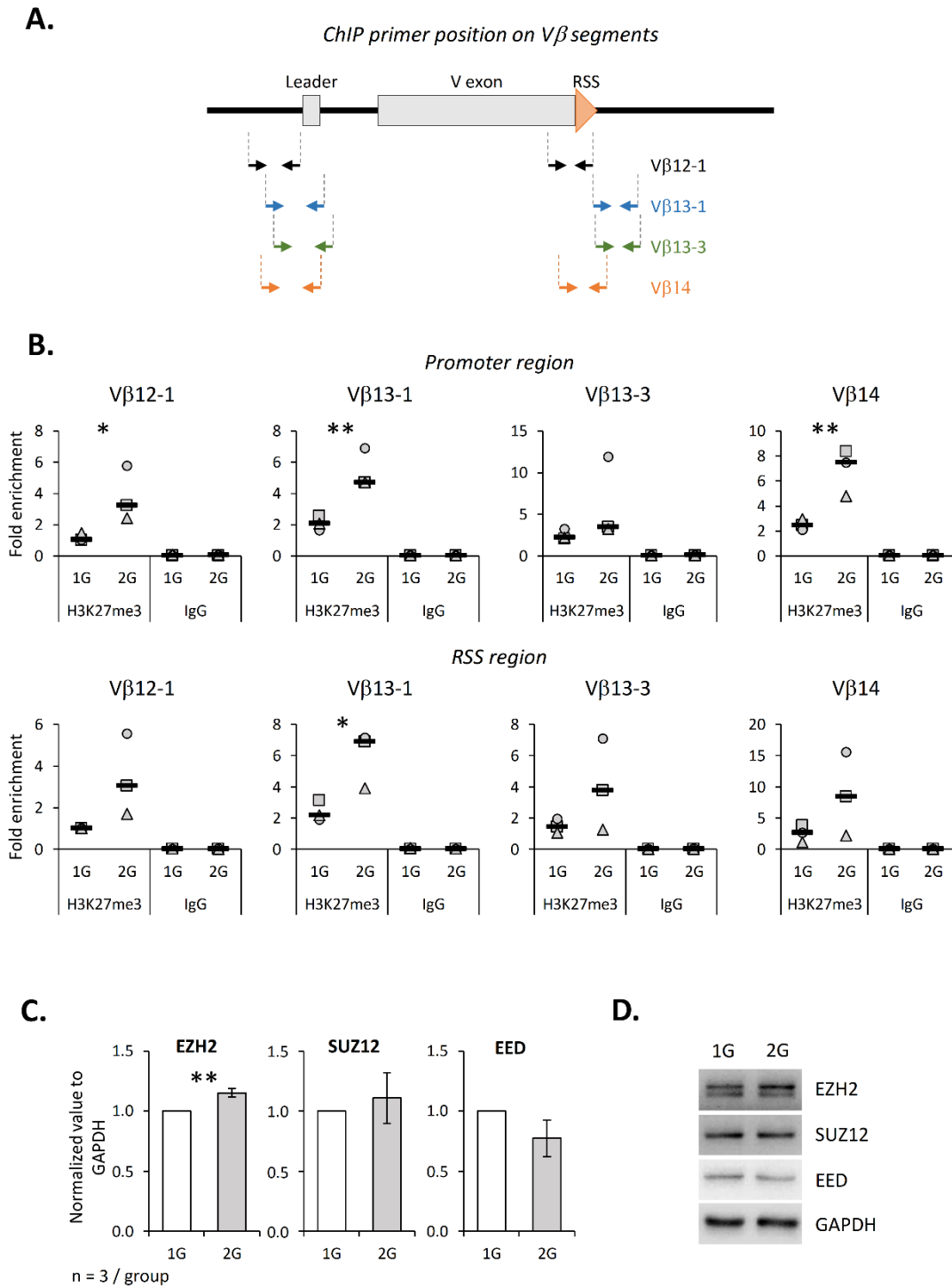


Figure 5. Hypergravity induces H3K27 tri-methylation increase at Vβ regions in the SCIET27 cell

line. (A) Schematic representation of primer positions along one V β gene segment. V β 12-1, V β 13-1, V β 13-3 and V β 14 segments are composed of two exons (gray). Recombination signal sequences (RSS) are localized at the 3' end of the V exon (orange triangle). Two pairs of primers were used for each V β segment; one localized on the promoter region and one localized near the RSS. (B) The presence of trimethylated H3K27 on the four V β segments was analyzed by ChIP. Graphics present the fold enrichment of H3K27me3 on the eight different chromatin regions. Symbols correspond to three independent experiments. Median is indicated as a black line. (C,D) Relative expression of PRC2 components (EZH2, Suz12 and EED) studied by Western blotting and normalized to GAPDH. (C) Levels of EZH2, Suz12 and EED normalized to GAPDH. (D) Western blots representative of three independent experiments. Data are mean \pm SD of three independent experiments. *T*-tests or Mann–Whitney tests were used to reveal statistically significant differences. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01.

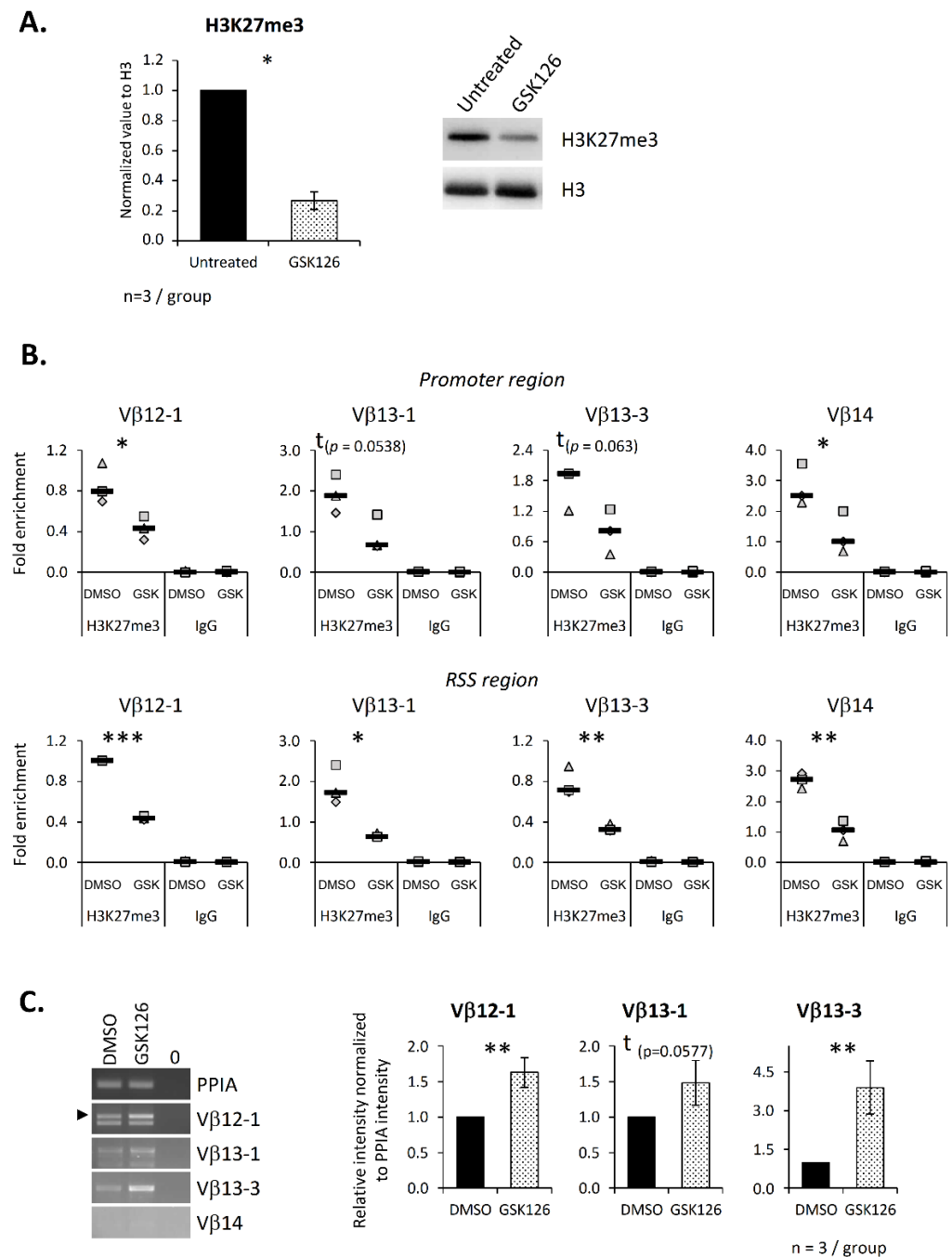


Figure 6. EZH2 inhibition alters germline transcript expression due to a decrease in H3K27me3 on

the V β segment promoter and recombination signal sequence regions. The SCIET27 cell line was treated overnight with the specific inhibitor GSK126 at a concentration of 2 μ M. Both the mRNA and histones were extracted, and ChIP was performed. (A) To evaluate the efficiency of GSK126 inhibition, the H3K27me3 level was quantified by Western blotting. The right panel shows one representative Western blot out of three independent experiments. The left panel presents the relative expression of H3K27me3 normalized to histone H3 used as a loading control. (B) The presence of trimethylated H3K27 on the promoter and the RSS regions of four V β segments was analyzed by ChIP. Graphics present the enrichment of H3K27me3 on the eight different chromatin regions. Symbols correspond to three independent experiments. Median is indicated as a black line. (C) Expression of four V β germline transcripts evaluated by semiquantitative PCR. Left panel, representative experiment out of three independent experiments. Right panel, relative intensity of the V β germline transcripts' amplification normalized to PPIA intensity. Data are mean \pm SD of three independent experiments. Mann–Whitney tests (A,C) or *t*-tests (B) were used to reveal statistically significant differences. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, t indicates a tendency.

Altogether, these results suggest that in some cases EZH2, via regulation of the H3K27me3 level on the V β segments, might contribute directly to germline transcript expression but that, in other cases (V β 14), other actors are required. Indeed, we could not detect V β 14 germline transcripts but could detect a decrease in H3K27me3 on its promoter and RSS regions. This observation could be due to the fact that a histone tail can carry different types of modifications acting together to generate histone code.

3. Discussion

Only a few studies have investigated the effects of spaceflight on lymphocyte development [18–23,33–35]. This study aimed to determine the impact of chronic gravitational change on murine T-cell development and to understand the molecular mechanisms responsible for TCR β repertoire modification.

We found that 21 days spent at $2 \times g$ induced an increase in the murine thymus mass but decreased its cellularity. This increase in the thymus mass was also observed in male pups developed under hypergravity (2G) conditions [21]. Several studies have reported the impact of spaceflight on mouse and rat thymus masses, but the conclusions have been inconsistent. The mass of this organ has been reported to decrease [23,36], increase [37] or remain constant [38,39]. Such observations might be due to variable experimental conditions encountered during space missions. We noted that this increase in thymus mass was associated with reductions in lymphocyte absolute numbers at all stages of T-cell development. This observation contradicts the results reported by Tateishi et al. [40], who did observe a decrease in the murine C57BL/6 thymus mass and cellularity. This discrepancy could be explained by the difference in hypergravity exposure duration; our mice were exposed for 3 weeks versus 2 weeks for Tateishi and colleagues [40]. Horie and collaborators [23] also noted a decrease in thymocytes and attributed this decrease to an increase in corticoid production during spaceflight, which is able to stimulate thymocyte apoptosis. In our case, we did not detect significant increases in serum corticosterone, as previously noted by Guéguinou et al. [41], nor in apoptosis in the thymus of hypergravity mice, suggesting that the negative impact of hypergravity on thymocyte development could involve glucocorticoid-independent pathway(s). However, we cannot exclude this possibility, as we only quantified the corticosterone in sera, and not the glucocorticoids produced inside the thymus, and the detection of apoptosis is very difficult in the thymus due to the continuous clearance of apoptotic cells by the macrophages [42–44]. Another hypothesis to explain the decrease in cellularity is cell cycle arrest. Indeed, spaceflight seems to impact the regulation of cell cycle factors [23] but the quantification of Cyclin D1 mRNAs does not support this hypothesis. However, again, we cannot exclude this possibility because our cell cycle study is limited and our results suggest a modification of EZH2 activity, which is known to be involved in cell cycle regulation, autophagy, apoptosis and cellular senescence [45–47]. Taken together, these data indicate that different phenomena are likely responsible for the thymocyte number decreases under hypergravity conditions.

A likely explanation for a global lymphocyte decrease is a modification of thymic microenvironment, which is essential for T-cell development. Different cell types contribute to this microenvironment, including thymic epithelial cells (TECs) whose number and functions have been shown to be reduced in hypergravity mice [40]. Additionally, TEC development and function are partly regulated by the PRC2 complex [48]. PRC2 inactivation in TECs has been shown to induce a modification of the TCR β chain diversity in the SP4 and SP8 cells [48]. In accordance with these observations, we observed a global decrease in H3K27me3 in the thymus of 2G mice, suggesting an alteration of the PRC2 activity. Consequently, PRC2 could perhaps also be altered in TECs, thereby modifying their development and function and, consequently, T lymphopoiesis.

At the molecular level, epigenetics contributes to V(D)J recombination regulation [11–14]. Our previous study suggested that hypergravity modifies the TCR β repertoire by affecting the chromatin structure at the level of the TCR β locus [21]. Our germline transcripts analyses performed in the thymus of the 2G mice support this hypothesis, as they suggest chromatin remodeling and, more precisely, chromatin opening. Interestingly, microgravity-exposed human blood-derived stem cells were shown to present an increase in H3K27me3 [29], while a decrease in H3K27me3 at specific promoters was observed in human mesenchymal stem cells differentiated in vitro in microgravity [30]. These data show that the level of H3K27me3 is impacted by gravitational stress in various cell types and that this level could vary locally or globally. Consequently, we studied the impact of hypergravity on the promoter and RSS regions of four V β segments in the SCIET27 cell line. Interestingly, we observed a significant increase in H3K27me3 at three V β promoter regions in response to hypergravity exposure, while only one RSS region presents a significant increase in H3K27me3, which shows that modifications occur preferentially at the promoter region. This result is apparently in contradiction with our global analysis on thymocytes. However, it is important to note that a global decrease noted at the level of a tissue cannot predict a decrease at specific DNA regions in the cell type composing this tissue. We performed our ChIP experiments on the SCIET27 cell line and not on primary thymocytes because DN2 cells (the population equivalent to the SCIET27 cell line) is a rare population. As a result, our overall analysis is not predictive of what is happening in this subpopulation. Consequently, in the future, it would be very interesting to study the H3K27me3 distribution along the genome in different thymic subpopulations to determine whether the H3K27me3 landscape is altered in response to a gravity change, with a focus on the DN2 subpopulation to evaluate the status of the TCR β locus before V(D)J recombination. However, given that chromatin is regulated by a large combination of histone posttranslational modifications, it will also be necessary to enlarge epigenetic studies to include more modifications, such as H3K4me3, which is associated with chromatin opening and transcription, in contrast to H3K27me3.

Different enzymatic activities are implicated in the regulation of H3K27 methylation. PRC2, via EZH2 or its homolog EZH1, adds methyl groups, while KDM6a and KDM6b demethylate this lysine [49]. In this study, we concentrated our attention on EZH2, as it is known to be essential for T-cell development [8,9]. Furthermore, EZH2 is the main effector of H3K27 methylation in DN subpopulations [8,10], as confirmed by our treatment of the SCIET27 DN2 murine cell line with the GSK126 inhibitor. Our results suggest a direct implication of EZH2 in TCR β 's chromatin structure regulation. Indeed, we observed specific decreases in H3K27 trimethylation at 5' and 3' ends of four V β segments in response to the GSK126 treatment. These results, combined with the germline transcripts' data, suggest an implication of EZH2 in the regulation of V(D)J recombination while the non-exhaustive study of Su et al. evidenced no implication in V(D)J recombination [8].

Finally, we showed that in the SCIET27 cell line, hypergravity induced a global increase in EZH2 protein level, which was not correlated with an increase in H3K27me3. This absence of correlation could be due to a modification of the balance between the methylase (EZH2/EZH1) and demethylase (KDM6a/b) activities that coexist within cells. To our knowledge, no data currently exist concerning KDM6a/b's function in the thymus.

Thus, it would be very interesting to test this hypothesis in the future. Another hypothesis is a modification of EZH2's function. Indeed, EZH2 can methylate H3K27, but it can also act on nonhistone proteins, such as talin [50] or promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) [51]. Moreover, it has recently been shown that EZH2 is involved in the regulation of centrosome polarization in SCIET27 cells [52]. As cytoskeletons are impacted by gravitational force alteration [53–56], EZH2 could perhaps interact differently with its targets to contribute to cell adaptation, which could explain this absence of correlation. Consequently, in the future it will be interesting to study the impact of gravitational forces on the different functions of EZH2 in the various subpopulations of thymocytes.

Note that this study is limited by the fact that we could not quantify the glucocorticoids produced within the thymus; the lack of quantification of hormones, such as ACTH, CRF and catecholamines; the difficulty in detecting apoptosis in the thymus; a limited study of cell cycle; and the fact that the balance between methylase (EZH2/EZH1) and demethylase (KDM6a/b) activities was not studied.

In conclusion, our results show for the first time that the level of a specific histone modification, H3K27me₃, is decreased in the murine thymocytes following hypergravity exposure and that these alterations will probably induce epigenome modifications that contribute to a decrease in the absolute T-cell number. In the future, it will be interesting to study more extensively the epigenomes of various thymocyte subpopulations to improve our understanding of alterations in T lymphopoiesis in response to gravity changes, especially under simulated or real microgravity conditions, and pay more attention on the TCR loci structure to understand how its modification will impact the TCR repertoire's creation.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Experimental procedures were carried out in conformity with the French National Legislation and the Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (2010/63/UE). Experiments were approved by the French Ministry of Research (authorization 04827), and authors complied with the ARRIVE guidelines. The mice used in this study were 7-week-old male C57BL6/J mice purchased from Charles River (L'arbresles, France). For acclimation to animal house conditions, mice were housed for a week in standard cages (four mice per cage, 36 cm × 20 cm × 14 cm) in a quiet room under constant conditions (22 °C, 50% relative humidity, 12-h light/dark cycles) with free access to standard food and water. Animals were anesthetized using 5% isoflurane and then put to death by cervical dislocation.

4.2. Mice Hypergravity Exposure

Standard cages (36 cm × 20 cm × 14 cm) containing four mice were placed in a large radius centrifuge (radius of 1.80 m) [57] with a rotational speed of 32 rpm, producing a gravity vector of 2 × *g* (Supplementary Figures S7 and S8). Mice were supplied with enough food and water for 3 weeks so that the centrifuge was operating continuously. Mice were left undisturbed during the 3 weeks of centrifugation. An infrared video allowed remote day and night control of the mice in gondolas. All environmental variables, except the gravity level, were the same as in standard housing. The cages containing control mice were placed in opaque gondolas similar to and in the same room as the centrifuged mice but in a static position. At the end of the 21 days of centrifugation, control and 2G mice were immediately anesthetized using 4% isoflurane and put to death for biological sample collection.

4.3. Antibodies, Reagents and Cell Line

Anti-CD4 PE (RM4-5), anti-CD8a PECy7 (53-6.7), anti-TCRβ FITC (H57-597), anti-CD3 APC (17A2) and the respective isotype controls were purchased from Biolegend (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Anti-GAPDH (G9545) and anti-EZH2 (07-689) used for Western blot, and anti-EED (AA19), anti-H3K27me₃ (07-449), anti-H3K4me₂ (07-030)

and anti-H3K9ac (07-352) antibodies were purchased from Merck Millipore (St.-Quentin-en-Yvelines, France). Anti-Suz12 (D39F6) and anti-H3K9-panmethyl (4069) antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). The anti- γ H2A.X (39118) and the anti-H3 C-terminal (39164) antibodies were obtained from Active Motif (La Hulpe, Belgium). Anti-PARP1 antibody (GTX100573) came from Gentex (Zeeland, MI, USA). The EZH2 inhibitor GSK126 was purchased from Interchim (Montluçon, France) (Table S1).

The SCIET27 cell line was kindly provided by I. Screpanti (Laboratory of Molecular Pathology, Sapienza University of Rome, Rome, Italy) and I. Aifantis (New York University, School of Medicine, New York, NY, USA) (Table S1).

4.4. Flow Cytometry

Thymuses were dissociated in PBS–2% FCS, and cells were counted using a Scepter Cell Counter (Merck Millipore, St.-Quentin-en-Yvelines, France). To identify DN, DP, SP4 and SP8 subpopulations, cells were stained with anti-CD4 PE, anti-CD8a PE-Cy7, anti-TCR β FITC and anti-CD3 APC (Figure S1A,B). This staining was also used to evaluate putative contamination in the DN subpopulation (Figure S1C). An amount of 5×10^5 fresh cells were stained for 30 min in PBS–2% FCS at 4 °C and then washed in PBS–2% FCS. Data acquisition was performed using a Gallios Beckman Coulter flow cytometer, and data analysis was performed using FlowJo software (TreeStar, Inc., Ashland, OR, USA).

4.5. Serum Corticosterone

Serum corticosterone concentration was measured in duplicate using a commercial ELISA kit (Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit, Arbor Assays, Euromedex, France), according to manufacturer's instructions, and serum samples were prepared from blood collected between 8 and 10 a.m.

4.6. Cell Culture, EZH2 Inhibition and Hypergravity Exposure

The SCIET27 cell line was cultured in IMDM (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) supplemented with 0.1 mM penicillin, 0.1 mM streptomycin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 10% FCS (Gibco, Thermo Fisher) according to Aifantis et al. 2001 [58].

For EZH2 inhibition, SCIET27 cells were plated at 1.5×10^6 cells/mL in IMDM medium supplemented with 10% FCS, 0.1 mM penicillin and 0.1 mM streptomycin in the absence or presence of 2 μ M GSK126 inhibitor and incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂.

For hypergravity exposure, SCIET27 cells were plated at 1.5×10^6 cells/mL in IMDM medium supplemented with 10% FCS, 0.1 mM penicillin and 0.1 mM streptomycin in the Petaka[®]G3 culture device (Celartia, Columbus, OH, USA). Then, the Petaka[®]G3 devices were placed overnight in a centrifuge (radius of 10.5 cm) with a rotational speed of 132 rpm producing a gravity vector of $2 \times g$, which was placed in an incubator set at 37 °C (Supplementary Figure S9). Control Petaka[®]G3 devices were placed in the same incubator but not subjected to hypergravity exposure.

Histones and total RNA were extracted from SCIET27 cells subjected to EZH2 inhibition or hypergravity exposure as described below, and ChIP was performed.

4.7. Total RNA Extraction and Reverse Transcription

RNA was extracted from the thymus of hypergravity and control mice using the RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and from 10×10^6 dissociated thymocytes using the All prep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). In both cases, RNA was reverse transcribed using random primers, RNaseOut and MML-V reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), following the manufacturer's instructions.

4.8. Quantitative PCR

The qPCRs were performed in triplicate using Takyon No ROX SYBR MasterMix blue dTTP (Eurogentec, Liège, Belgium) and a Mastercycler Realplex2 Real-Time PCR System (Eppendorf, Hamburg, Germany). The cycling program was: 5 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 45 s at the annealing temperature indicated in Table 1. Relative expression of Cyclin D1 transcripts was standardized using 3 housekeeping transcripts (EIF3F, RPL13A and PPIA) using a method previously described [22]. Primers used to amplify transcripts were designed in different exons to avoid the amplification of potential genomic DNA traces. Primer specificity was checked using a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search through the US National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA).

Table 1. Primers used to perform RT-qPCR.

Target	Sequences	Length (bp)	Annealing Temperature (°C)
PPIA	F 5'-GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC-3' R 5'-GCGTGTAAGTCACCACCCT-3'	150	58
EIF3F	F 5'-CATCAAGGCCTATGTCAGCA-3' R 5'-GTGGTGGGACTGTGTGTCTGG-3'	117	61
RPL13A	F 5'-GGAAGCGGATGAATACCAAC-3' R 5'-CTTGTCATAGGGTGGAGGGA-3'	167	61
Cyclin D1	F 5'-TGACTGCCGAGAAGTTGTGC-3' R 5'-CATCGAACACTTCCTCTCCA-3'	144	62

4.9. Germline Transcripts Amplification

Semiquantitative PCR amplifications were performed because some V β segments have highly homologous DNA sequences that prevent the design of specific primers that generate 150–200 bp amplicons, a prerequisite to perform real-time PCR. To ensure the specificity of our amplifications, we had to design primers in leader and V-encoding exons, thereby generating amplification products >200 bp. These polymerase chain reactions (PCRs) were done using 0.625 U of Taq Polymerase (Thermo Fisher) and 0.7 μ M of each primer. The PCR program was 5 min at 95 °C, followed by cycles of 45 s at 95 °C, 45 s at the annealing temperature indicated in Table 2, 1 min at 72 °C and a final elongation at 72 °C for 10 min. The number of PCR cycles was chosen to be in the linear range of exponential amplifications. The PCR products were run on 1.5% agarose gels and visualized using the Fusion FX7 camera (Vilbert-Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Quantifications of the amplification products were performed using ImageJ software (NIH) and normalized to PPIA amplification (housekeeping gene).

Table 2. Primers used to quantify TCR β germline transcripts.

Target	Sequences	Length (bp)	Annealing Temperature (°C)
V β 3	F 5'-ATGGATATCTGGCTTCTAGGT-3' R 5'-GTTTGTGTACAGGAAGACGGT-3'	470	54
V β 12-1	F 5'-CATCCTGAGAAGAAGCATGTC-3' R 5'-TTACAGAAAGCCAGTAGCTTTG-3'	550	55
V β 13-1	F 5'-CACTAAGTCACTGAAAGCCC-3' R 5'-CCACACATCACTGTGCATC-3'	524	54

Table 2. Cont.

Target	Sequences	Length (bp)	Annealing Temperature (°C)
Vβ13-2	F 5'-TCCAGGCTCTTCTTCGTG-3' R 5'-CCCCACATCACTGTGCATCA-3'	446	56
Vβ13-3	F 5'-AGCCCCAGTTCTAATTTACC-3' R 5'-GAAGGAAGCCACACATCAC-3'	523	54
Vβ14	F 5'-GGCAGTGTCTGTCTCCTTG-3' R 5'-GAAAACCATCAGCTTTGTGC-3'	477	55
Vβ19	F 5'-AACAAAGTGGGTTTTCTGCTG-3' R 5'-ATGGAGAGGGGGTAGCTGT-3'	488	59
Vβ29	F 5'-GTTAGGCTCATCTCTGCTGTG-3' R 5'-GAAAGGATGTGGCTGTGTAGA-3'	500	54
PPIA-2	F 5'-CACCGTGTCTTCGACATCA-3' R 5'-TTCTGTGAAAGGAGGAACCC-3'	155	62

4.10. RACE-PCR and Vβ Segment Usage

TCRβ mRNAs were amplified by 5'-RACE PCR using the SMARTer™ RACE cDNA amplification kit (Takara Bio, Inc., Mountain View, CA, USA). Briefly, for each experiment or treatment, total RNA from the thymus or thymocytes of 8 or 12 mice (depending on the experiment) was mixed in equimolar quantities, and 200 ng of this mix were reverse transcribed according to the manufacturer's instructions. Then, TCRβ mRNAs were preamplified via two successive PCRs using Advantage 2 Taq DNA polymerase (Takara Bio, Inc., Mountain View, CA, USA). The first PCR was performed using the GSP1 primer (Table 3) annealing to the TCRβ constant region and the UPM primer provided in the kit. The second reaction was a nested PCR performed using NGSP (specific to the TCRβ constant region but annealing upstream of GSP1) and NUP primers. Specific PCR products (approximately 650 bp) were purified using the NucleoSpin gel and PCR clean up kit (Macherey Nagel, Hoerd, France), diluted and used as templates to perform Vβ-specific semiquantitative PCRs as explained above. These reactions were performed using Vβ-specific primers and the NGSP primer (Tables 3 and 4). PCR products were run on a 1.5% agarose gel and visualized using an FX7 camera (Vilbert-Lourmat). Quantification of the amplification products was performed using ImageJ software (NIH) and normalized over TCRβ constant region amplification obtained using the TCRβ-For and NGSP primers. Then, each normalized signal was expressed as a percentage of the sum of the normalized signals obtained for the 11 studied Vβ segments. Then, these percentages were used to calculate dispersion indexes according to Fonte et al. [22]. These indexes were used to perform two types of comparisons. First, we compared variations between experiments (I(inter-exp)) to evaluate the normal variation in Vβ segment usage independently of the treatment and used this index as a reference. Second, we evaluated variations between 1G and 2G conditions (I(1G-2G)).

Table 3. Primers used to perform RACE-PCR.

Target	Sequences	Annealing Temperature (°C)
GSP1	5'-CCCACTGTGGACCTCCTTGCCATTACCC-3'	68
NGSP	5'-CACGTGGTCAGGGAAGAAGCCCTGGCC-3'	68
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	68

Table 4. Primers used to study V β usage in the TCR β repertoire.

Target	Sequences	Length (bp)	Annealing Temperature (°C)	
V β 3	5'-ATGGATATCTGGCTTCTAGGT-3'	600 to 650 bp	60	
V β 4	5'-CTGTAGGCTCCTAAGCTGTG-3'		62	
V β 5	5'-GCTTCTCCTCTATGTTCCCT-3'		60	
V β 13-1	5'-GGCTCTTTCTGGTCTTGAGC-3'		57	
V β 13-3	5'-CCAGACTCTTCTTTGTGGTTTT-3'		62	
V β 14	5'-GGCAGTGTCTGTCTCCTTG-3'		54	
V β 17	5'-TGATCTTCTGTCTTCTTGACAG-3'		62	
V β 19	5'-AACAAGTGGGTTTCTGCTG-3'		58	
V β 26	5'-GCTACAAGGCTCCTCTGTTA-3'		62	
V β 29	5'-GTTAGGCTCATCTCTGCTGTG-3'		60	
V β 31	5'-GGTGTTAGTGCTCAGACTATC-3'		54	
TCR β -For	5'-GATCTGAGAAATGTGACTCCAC-3'		120	60

4.11. Total Protein Extraction

Proteins were extracted from thymus lysed in total buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 0.4 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 5% glycerol, 0.5% NP40) supplemented with Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail following the manufacturer's instructions (Thermo Fisher) at a ratio of 10 mg of tissue for 100 μ L of total buffer. This lysis was performed on ice for 30 min. Then, tubes were centrifuged at 13,500 \times g for 15 min at 4 °C, and supernatants were collected. Proteins were extracted from dissociated thymocytes using the All prep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

4.12. Histone Extraction

Histones were extracted from thymuses homogenized in TEB buffer (0.2% Triton X-100 (*v/v*), 0.02% NaN₃ (*w/v*), 5 mM sodium butyrate, 1 \times PBS) supplemented with Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher) at a ratio of 15 mg of tissue for 500 μ L of TEB buffer for 10 min on ice with regular mixing. Histones were extracted from 5 \times 10⁷ dissociated thymocytes by mixing them with 750 μ L of TEB buffer and incubating the obtained solution on ice for 10 min. Then, in both cases, samples were centrifuged at 800 \times g for 10 min at 4 °C. Pellets were washed with TEB buffer (100 μ L for the tissue, 150 μ L for thymocytes) and incubated overnight with 0.2 M HCl at 4 °C (60 μ L for the tissue, 30 μ L for thymocytes). A final centrifugation at 6000 \times g for 10 min at 4 °C was performed, and the supernatants containing histones were recovered.

4.13. Western Blot

Total proteins or histone extracts were quantified using the Bradford method. To start, 10 to 30 μ g of total proteins or 10 μ g of histones were heated at 95 °C for 5 min, run on 10% SDS-polyacrylamide gels for proteins or 16% SDS-polyacrylamide gels for histones and transferred to PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK). Membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4 °C and then with corresponding HRP-coupled secondary antibodies for 1 h at room temperature. Blots were stripped and probed again as necessary. An anti-GAPDH antibody or an antibody directed against the C-terminal tail of histone H3 was used as a loading control for total proteins or histones, respectively. Pierce ECL Western blotting substrate (Thermo Fisher) was used for immunodetection, and signals were visualized by chemiluminescence using a Fusion FX7

camera (Vilbert-Lourmat). Signal intensity was quantified using ImageJ software (NIH) and normalized over the corresponding loading control.

4.14. Chromatin Immunoprecipitation

ChIP was performed as described in Ghislin et al., 2012 [59] with some modifications. Cells were cross-linked by adding 10× fixation buffer (11% formaldehyde, 50 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) at room temperature for 10 min. The cross-linking reaction was stopped by the addition of glycine to reach a final 1× concentration and incubation for 5 min at room temperature. After centrifugation (300× *g*, 5 min, 4 °C), the cells were washed in 1× PBS. Then, cell prelysis was performed as previously described [59]. Cells were lysed by incubation for 5 min on ice at 1.2×10^6 cell/mL in lysis buffer (35 mM Tris-HCl pH 8.1, 5.8 mM EDTA, 75 mM NaCl, 0.3% Triton X-100, 0.5% SDS, 5 mM sodium butyrate) supplemented with Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich, MO, USA). Cell lysates were diluted five times in sonication buffer (23 mM Tris HCl pH 8.1, 2.44 mM EDTA, 135 mM NaCl, 0.54% Triton X-100, 0.132% SDS, 5 mM sodium butyrate) supplemented with protease inhibitors; 300 µL of cell lysate were sonicated for 3 cycles of 30 s using the ultralow program of the Bioruptor Pico sonication device (Diagenode, Liège, Belgium) and then centrifuged for 10 min at 4 °C at maximum speed. Supernatant containing chromatin was collected. For immunoprecipitation, 50 µL of Dynabeads protein A (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) were washed 3 times with IP Buffer (17.5 mM Tris-HCl pH 8.1, 1.3 mM EDTA, 162 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.02% SDS) and blocked with IP Buffer containing 5% BSA and 0.2 µg/µL of salmon sperm (Sigma Aldrich, MO, USA) for 2 or 12 h at 4 °C. Then, 250 µL of chromatin were diluted with 250 µL of IP buffer supplemented with 2.5% BSA and protease inhibitors. Chromatin was precleared by adding 20 µL of blocked Dynabeads and incubating for 1 h at 4 °C. Collected chromatin was then incubated overnight at 4 °C with 1.5 µg of antibodies (anti-H3K27me3 (C15410069, Diagenode) or isotype control (IgG control, C15410206, Diagenode)). Before adding antibodies, 2.5 µL of chromatin (input control) was collected and stored at 4 °C. Finally, immunoprecipitation was performed. A total of 30 µL of blocked Dynabeads were added to chromatin and incubated for 20 min at room temperature. Dynabead complexes were washed twice with low salt wash buffer (0.1% SDS (*v/v*), 1% Triton X-100 (*v/v*), 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1), twice with high salt wash buffer (0.1% SDS (*v/v*), 1% Triton X-100 (*v/v*), 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 500 mM NaCl), twice with LiCl wash buffer (250 mM LiCl, 1% NP-40 (*v/v*), 1% sodium deoxycholate (*v/v*), 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8.1) and twice with TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.1, 1 mM EDTA). Crosslinking was reversed by incubating Dynabeads complexes in elution buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.1, 1 mM EDTA, 1% SDS (*v/v*)) overnight at 65 °C, followed by incubation at 37 °C for 1 h with proteinase K 0.5 mg/mL. DNA fragments were purified using NTB Buffer and the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) following the manufacturer's instructions. Quantitative PCRs (qPCR) were performed in triplicate using Takyon No ROX SYBR MasterMix blue dTTP (Eurogentec, Liège, Belgium) and a Mastercycler Realplex2 Real-Time PCR System (Eppendorf, Hamburg, Germany). The cycling program was 5 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 45 s at the annealing temperature indicated in Table 5. Primers (Eurogentec, Liège, Belgium) were designed to amplify the promoter or the 3' end of Vβ segments containing the recombination signal sequences. Primer specificity was checked using a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search through the US National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA).

Table 5. Primers used for ChIP experiments.

Target	Sequences	Length (bp)	Annealing Temperature (°C)
Promoter	Vβ12-1 F 5'-CACAGAAGGGCATAGCCAAC-3' R 5'-TGCTGGTCCTCTTGGTGAGA-3'	179	61
	Vβ13-1 F 5'-CACTAAGTCACTGAAAGCCC-3' R 5'-CACTTGACACAGGAGGCTC-3'	122	61
	Vβ13-3 F 5'-AGCCCCAGTTCTAATTTACC-3' R 5'-CTGACCAGCACTCACTTGCA-3'	122	61
	Vβ14 F 5'-GACTGATTCTCTGAAGGGACA-3' R 5'-CAAGGAGACAGAACAAGTCC-3'	155	61
RSS region	Vβ12-1 F 5'-CATGAGTGCCTTGGAACTGG-3' R 5'-TTACAGAAAGCCAGTAGCTTTG-3'	87	62
	Vβ13-1 F 5'-TCAGGAAGTCCCTGCCTCTA-3' R 5'-TGGCCTTCGGGCAGCTAGAAA-3'	86	62
	Vβ13-3 F 5'-CTAGCTCTCTGTGTACCCCA-3' R 5'-AGGATGAGACTCATGCTGTG-3'	91	60
	Vβ14 F 5'-GGCCTAAAGGAACTAAGTCC-3' R 5'-ACCATCAGCTTTGTGCACAG-3'	130	62

4.15. Statistics

Statistical analyses were performed using StatView software (SAS Institute, Cary, NC, USA). For two-group comparisons, the homogeneity of variance was assessed with Fisher's test and the normality of distribution was assessed with the Kolmogorov–Smirnov test. When both criteria were validated, *t*-tests were performed. When the variance and/or the distribution was not confirmed, Mann–Whitney nonparametric tests were performed. For more than two group comparisons, the homogeneity of variance and normality of distribution were checked using the Levene and Shapiro–Wilk tests, respectively. If these two sets of test criteria were met, ANOVA tests followed by post hoc Tukey–Kramer tests were performed for two by two comparisons. In the other cases, Kruskal–Wallis tests followed by post hoc Dunn tests were performed. Here, *p* values <0.05 indicate significance. All in vivo results are shown as the mean ± standard error of the mean (SEM). All in vitro results are shown as the mean ± standard deviation (SD).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23137133/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, S.G. and J.-P.F.; methodology, G.C., N.O., S.G. and S.K.; formal analysis, G.C. and S.G.; investigation, S.G. and J.-P.F.; writing—original draft preparation, review and editing, G.C., S.G. and J.-P.F.; supervision, S.G. and J.-P.F.; funding acquisition, J.-P.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French Space Agency (DAR 4800001008, DAR 4800001059 and DAR 4800000584), the French Ministry of Higher Education and Research, the Université de Lorraine, the Région Lorraine and the Contrat de Plan Etat-Région.

Institutional Review Board Statement: Experimental procedures were carried out in conformity with the French National Legislation and the Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (2010/63/UE). Experiments were approved by the French Ministry of Research (authorization 04827), and the authors complied with the ARRIVE guidelines.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We thank Arnaud Vanden-Bossche and Priscilla Orlando from the INSERM U1059 unit and the PLEXAN platform (University of Saint-Etienne, France) for efficient management of hypergravity exposure. We also thank the UMS2008 IBSLor for providing access to the Gallios Beckman Coulter flow cytometer.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

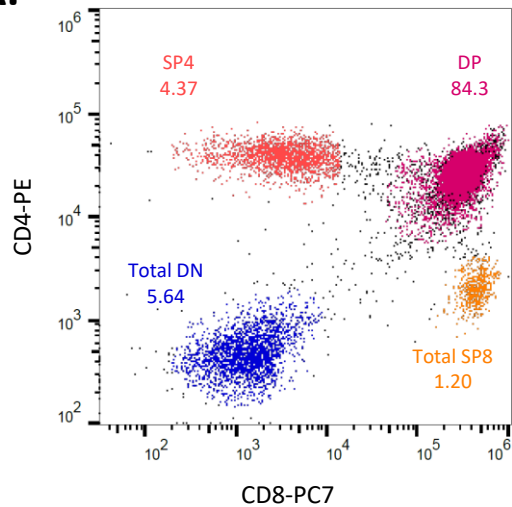
1. Van Ness, B.G.; Weigert, M.; Coleclough, C.; Mather, E.L.; Kelley, D.E.; Perry, R.P. Transcription of the Unrearranged Mouse C Kappa Locus: Sequence of the Initiation Region and Comparison of Activity with a Rearranged V Kappa-C Kappa Gene. *Cell* **1981**, *27*, 593–602. [CrossRef]
2. Yancopoulos, G.D.; Alt, F.W. Developmentally Controlled and Tissue-Specific Expression of Unrearranged VH Gene Segments. *Cell* **1985**, *40*, 271–281. [CrossRef]
3. Abarrategui, I.; Krangel, M.S. Regulation of T Cell Receptor-Alpha Gene Recombination by Transcription. *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 1109–1115. [CrossRef] [PubMed]
4. Bolland, D.J.; Wood, A.L.; Johnston, C.M.; Bunting, S.F.; Morgan, G.; Chakalova, L.; Fraser, P.J.; Corcoran, A.E. Antisense Intergenic Transcription in V(D)J Recombination. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 630–637. [CrossRef] [PubMed]
5. Hu, G.; Cui, K.; Fang, D.; Hirose, S.; Wang, X.; Wangsa, D.; Jin, W.; Ried, T.; Liu, P.; Zhu, J.; et al. Transformation of Accessible Chromatin and 3D Nucleome Underlies Lineage Commitment of Early T Cells. *Immunity* **2018**, *48*, 227–242.e8. [CrossRef] [PubMed]
6. Cieslak, A.; Charbonnier, G.; Tesio, M.; Mathieu, E.-L.; Belhocine, M.; Touzart, A.; Smith, C.; Hypolite, G.; Andrieu, G.P.; Martens, J.H.A.; et al. Blueprint of Human Thymopoiesis Reveals Molecular Mechanisms of Stage-Specific TCR Enhancer Activation. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, e20192360. [CrossRef]
7. Feeney, A.J. Epigenetic Regulation of Antigen Receptor Gene Rearrangement—PubMed. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21216580/> (accessed on 2 December 2021).
8. Su, I.-H.; Dobenecker, M.-W.; Dickinson, E.; Oser, M.; Basavaraj, A.; Marqueron, R.; Viale, A.; Reinberg, D.; Wülfing, C.; Tarakhovskiy, A. Polycomb Group Protein Ezh2 Controls Actin Polymerization and Cell Signaling. *Cell* **2005**, *121*, 425–436. [CrossRef]
9. Mochizuki-Kashio, M.; Mishima, Y.; Miyagi, S.; Negishi, M.; Saraya, A.; Konuma, T.; Shinga, J.; Koseki, H.; Iwama, A. Dependency on the Polycomb Gene Ezh2 Distinguishes Fetal from Adult Hematopoietic Stem Cells. *Blood* **2011**, *118*, 6553–6561. [CrossRef]
10. Jacobsen, J.A.; Woodard, J.; Mandal, M.; Clark, M.R.; Bartom, E.T.; Sigvardsson, M.; Kee, B.L. EZH2 Regulates the Developmental Timing of Effectors of the Pre-Antigen Receptor Checkpoints. *J. Immunol.* **2017**, *198*, 4682–4691. [CrossRef]
11. Gopalakrishnan, S.; Majumder, K.; Predeus, A.; Huang, Y.; Koues, O.I.; Verma-Gaur, J.; Loguercio, S.; Su, A.I.; Feeney, A.J.; Artyomov, M.N.; et al. Unifying Model for Molecular Determinants of the Preselection V β Repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E3206–E3215. [CrossRef]
12. Guo, C.; Gerasimova, T.; Hao, H.; Ivanova, I.; Chakraborty, T.; Selimyan, R.; Oltz, E.M.; Sen, R. Two Forms of Loops Generate the Chromatin Conformation of the Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Locus. *Cell* **2011**, *147*, 332–343. [CrossRef]
13. Jhunjhunwala, S.; van Zelm, M.C.; Peak, M.M.; Cutchin, S.; Riblet, R.; van Dongen, J.J.M.; Grosveld, F.G.; Knoch, T.A.; Murre, C. The 3D Structure of the Immunoglobulin Heavy-Chain Locus: Implications for Long-Range Genomic Interactions. *Cell* **2008**, *133*, 265–279. [CrossRef]
14. Skok, J.A.; Gisler, R.; Novatchkova, M.; Farmer, D.; de Laat, W.; Busslinger, M. Reversible Contraction by Looping of the Tcra and Tcrb Loci in Rearranging Thymocytes. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 378–387. [CrossRef]
15. 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? Available online: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19690292/?from_term=gueguinou+huin-schohn+bascove+2009&from_pos=1 (accessed on 26 May 2020).
16. 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]
17. 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]
18. Benjamin, C.L.; Stowe, R.P.; St John, L.; Sams, C.F.; Mehta, S.K.; Crucian, B.E.; Pierson, D.L.; Komanduri, K.V. Decreases in Thymopoiesis of Astronauts Returning from Space Flight. *JCI Insight* **2016**, *1*, e88787. [CrossRef]
19. 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.* **2003**, *17*, 1526–1528. [CrossRef]

20. 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](#)]
21. Ghislin, S.; Ouzren-Zarhloul, N.; Kaminski, S.; Fripiat, J.-P. Hypergravity Exposure during Gestation Modifies the TCR β Repertoire of Newborn Mice. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9318. [[CrossRef](#)]
22. 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- β Repertoire and Increase Its Self-Reactivity. *FASEB J.* **2019**, *33*, 896–908. [[CrossRef](#)]
23. Horie, K.; Kato, T.; Kudo, T.; Sasanuma, H.; Miyauchi, M.; Akiyama, N.; Miyao, T.; Seki, T.; Ishikawa, T.; Takakura, Y.; et al. Impact of Spaceflight on the Murine Thymus and Mitigation by Exposure to Artificial Gravity during Spaceflight. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 19866. [[CrossRef](#)]
24. Pandiarajan, M.; Hargens, A.R. Ground-Based Analogs for Human Spaceflight. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 716. [[CrossRef](#)]
25. Globus, R.K.; Morey-Holton, E. Hindlimb Unloading: Rodent Analog for Microgravity. *J. Appl. Physiol.* **2016**, *120*, 1196–1206. [[CrossRef](#)]
26. Bonnefoy, J.; Ghislin, S.; Beyrend, J.; Coste, F.; Calcagno, G.; Lartaud, I.; Gauquelin-Koch, G.; Poussier, S.; Fripiat, J.-P. Gravitational Experimental Platform for Animal Models, a New Platform at ESA's Terrestrial Facilities to Study the Effects of Micro- and Hypergravity on Aquatic and Rodent Animal Models. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2961. [[CrossRef](#)]
27. Cogoli, A. The Effect of Hypogravity and Hypergravity on Cells of the Immune System. *J. Leukoc. Biol.* **1993**, *54*, 259–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Eckert, J.; van Loon, J.J.W.A.; Eng, L.M.; Schmidt, T. Hypergravity Affects Cell Traction Forces of Fibroblasts. *Biophys. J.* **2021**, *120*, 773–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Gambacurta, A.; Merlini, G.; Ruggiero, C.; Diedenhofen, G.; Battista, N.; Bari, M.; Balsamo, M.; Piccirillo, S.; Valentini, G.; Mascetti, G.; et al. Human Osteogenic Differentiation in Space: Proteomic and Epigenetic Clues to Better Understand Osteoporosis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Koaykul, C.; Kim, M.-H.; Kawahara, Y.; Yuge, L.; Kino-Oka, M. Maintenance of Neurogenic Differentiation Potential in Passaged Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Under Simulated Microgravity Conditions. *Stem Cells Dev.* **2019**, *28*, 1552–1561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Dutta, S.; Sengupta, P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.* **2016**, *152*, 244–248. [[CrossRef](#)]
32. Zhang, J.A.; Mortazavi, A.; Williams, B.A.; Wold, B.J.; Rothenberg, E.V. Dynamic Transformations of Genome-Wide Epigenetic Marking and Transcriptional Control Establish T Cell Identity. *Cell* **2012**, *149*, 467–482. [[CrossRef](#)]
33. Huin-Schohn, C.; Guéguinou, N.; Schenten, V.; Bascove, M.; Koch, G.G.; Baatout, S.; Tschirhart, E.; Fripiat, J.-P. Gravity Changes during Animal Development Affect IgM Heavy-Chain Transcription and Probably Lymphopoiesis. *FASEB J.* **2013**, *27*, 333–341. [[CrossRef](#)]
34. 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.* **2015**, *29*, 455–463. [[CrossRef](#)]
35. 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.* **2019**, *33*, 3772–3783. [[CrossRef](#)]
36. 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.* **2009**, *106*, 1935–1942. [[CrossRef](#)]
37. Pecaut, M.J.; Simske, S.J.; Fleshner, M. Spaceflight Induces Changes in Splenocyte Subpopulations: Effectiveness of Ground-Based Models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2000**, *279*, R2072–R2078. [[CrossRef](#)]
38. Chapes, S.K.; Simske, S.J.; Sonnenfeld, G.; Miller, E.S.; Zimmerman, R.J. Effects of Spaceflight and PEG-IL-2 on Rat Physiological and Immunological Responses. *J. Appl. Physiol.* **1999**, *86*, 2065–2076. [[CrossRef](#)]
39. Congdon, C.C.; Allebban, Z.; Gibson, L.A.; Kaplansky, A.; Strickland, K.M.; Jago, T.L.; Johnson, D.L.; Lange, R.D.; Ichiki, A.T. Lymphatic Tissue Changes in Rats Flown on Spacelab Life Sciences-2. *J. Appl. Physiol.* **1996**, *81*, 172–177. [[CrossRef](#)]
40. Tateishi, R.; Akiyama, N.; Miyauchi, M.; Yoshinaga, R.; Sasanuma, H.; Kudo, T.; Shimbo, M.; Shinohara, M.; Obata, K.; Inoue, J.-I.; et al. Hypergravity Provokes a Temporary Reduction in CD4+CD8+ Thymocyte Number and a Persistent Decrease in Medullary Thymic Epithelial Cell Frequency in Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141650. [[CrossRef](#)]
41. Guéguinou, N.; Bojados, M.; Jamon, M.; Derradji, H.; Baatout, S.; Tschirhart, E.; Fripiat, J.-P.; Legrand-Frossi, C. Stress Response and Humoral Immune System Alterations Related to Chronic Hypergravity in Mice. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 137–147. [[CrossRef](#)]
42. Surh, C.D.; Sprent, J. T-Cell Apoptosis Detected in Situ during Positive and Negative Selection in the Thymus. *Nature* **1994**, *372*, 100–103. [[CrossRef](#)]
43. Savill, J.; Dransfield, I.; Gregory, C.; Haslett, C. A Blast from the Past: Clearance of Apoptotic Cells Regulates Immune Responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 965–975. [[CrossRef](#)]
44. Yélamos, J.; Monreal, Y.; Saenz, L.; Aguado, E.; Schreiber, V.; Mota, R.; Fuente, T.; Minguela, A.; Parrilla, P.; de Murcia, G.; et al. PARP-2 Deficiency Affects the Survival of CD4+CD8+ Double-Positive Thymocytes. *EMBO J.* **2006**, *25*, 4350–4360. [[CrossRef](#)]

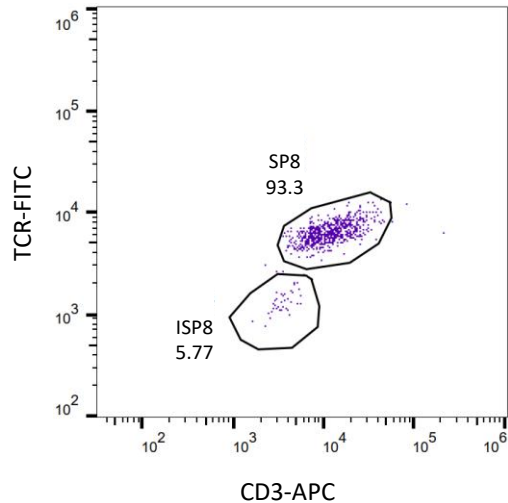
45. Nutt, S.L.; Keenan, C.; Chopin, M.; Allan, R.S. EZH2 Function in Immune Cell Development. *Biol. Chem.* **2020**, *401*, 933–943. [[CrossRef](#)]
46. Yao, Y.; Hu, H.; Yang, Y.; Zhou, G.; Shang, Z.; Yang, X.; Sun, K.; Zhan, S.; Yu, Z.; Li, P.; et al. Downregulation of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Is Essential for the Induction of Autophagy and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Genes* **2016**, *7*, 83. [[CrossRef](#)]
47. Ito, T.; Teo, Y.V.; Evans, S.A.; Neretti, N.; Sedivy, J.M. Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 3480–3492. [[CrossRef](#)]
48. Barthlott, T.; Handel, A.E.; Teh, H.Y.; Wirasinha, R.C.; Hafen, K.; Žuklys, S.; Roch, B.; Orkin, S.H.; de Villartay, J.-P.; Daley, S.R.; et al. Indispensable Epigenetic Control of Thymic Epithelial Cell Development and Function by Polycomb Repressive Complex 2. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3933. [[CrossRef](#)]
49. Kooistra, S.M.; Helin, K. Molecular Mechanisms and Potential Functions of Histone Demethylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 297–311. [[CrossRef](#)]
50. Gunawan, M.; Venkatesan, N.; Loh, J.T.; Wong, J.F.; Berger, H.; Neo, W.H.; Li, L.Y.J.; La Win, M.K.; Yau, Y.H.; Guo, T.; et al. The Methyltransferase Ezh2 Controls Cell Adhesion and Migration through Direct Methylation of the Extranuclear Regulatory Protein Talin. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 505–516. [[CrossRef](#)]
51. Vasanthakumar, A.; Xu, D.; Lun, A.T.; Kueh, A.J.; van Gisbergen, K.P.; Iannarella, N.; Li, X.; Yu, L.; Wang, D.; Williams, B.R.; et al. A Non-Canonical Function of Ezh2 Preserves Immune Homeostasis. *EMBO Rep.* **2017**, *18*, 619–631. [[CrossRef](#)]
52. Deshayes, F.; Fradet, M.; Kaminski, S.; Viguier, M.; Fripiat, J.-P.; Ghislin, S. Link between the EZH2 Noncanonical Pathway and Microtubule Organization Center Polarization during Early T Lymphopoiesis. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 3655. [[CrossRef](#)]
53. Meloni, M.A.; Galleri, G.; Camboni, M.G.; Pippia, P.; Cogoli, A.; Cogoli-Greuter, M. Modeled Microgravity Affects Motility and Cytoskeletal Structures. *J. Gravit. Physiol.* **2004**, *11*, P197–P198. [[PubMed](#)]
54. Meloni, M.A.; Galleri, G.; Pippia, P.; Cogoli-Greuter, M. Cytoskeleton Changes and Impaired Motility of Monocytes at Modelled Low Gravity. *Protoplasma* **2006**, *229*, 243–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Meloni, M.A.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Thiel, C.S.; Tauber, S.; Lauber, B.; Polzer, J.; Seebacher, C.; Uhl, R.; Neelam, S.; Zhang, Y.; Levine, H.; Ullrich, O. Rapid Morphological and Cytoskeletal Response to Microgravity in Human Primary Macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2402. [[CrossRef](#)]
57. Jamon, M.; Serradj, N. Ground-Based Researches on the Effects of Altered Gravity on Mice Development. *Microgravity Sci. Technol.* **2008**, *21*, 327. [[CrossRef](#)]
58. Aifantis, I.; Gounari, F.; Scorrano, L.; Borowski, C.; von Boehmer, H. Constitutive Pre-TCR Signaling Promotes Differentiation through Ca²⁺ Mobilization and Activation of NF-KappaB and NFAT. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 403–409. [[CrossRef](#)]
59. Ghislin, S.; Deshayes, F.; Middendorp, S.; Boggetto, N.; Alcaide-Loridan, C. PHF19 and Akt Control the Switch between Proliferative and Invasive States in Melanoma. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 1634–1645. [[CrossRef](#)]

Figure S1

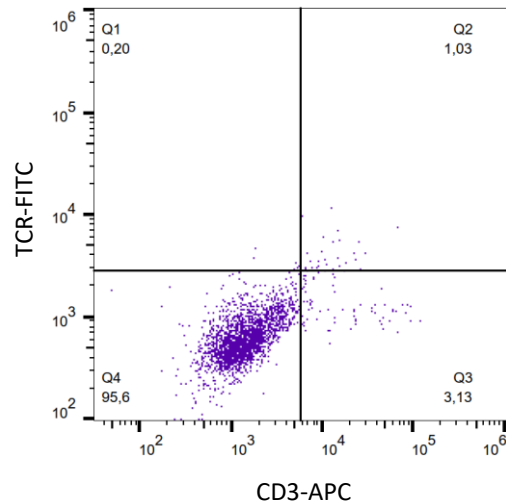
A.



B.

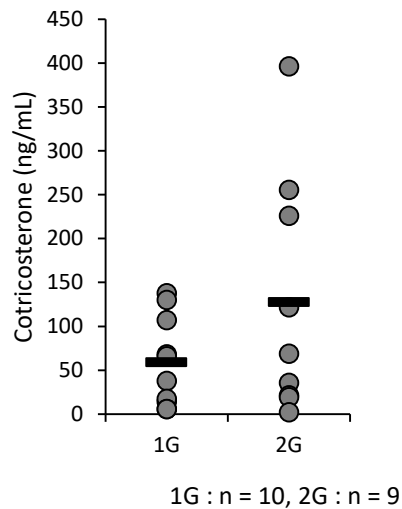


C.



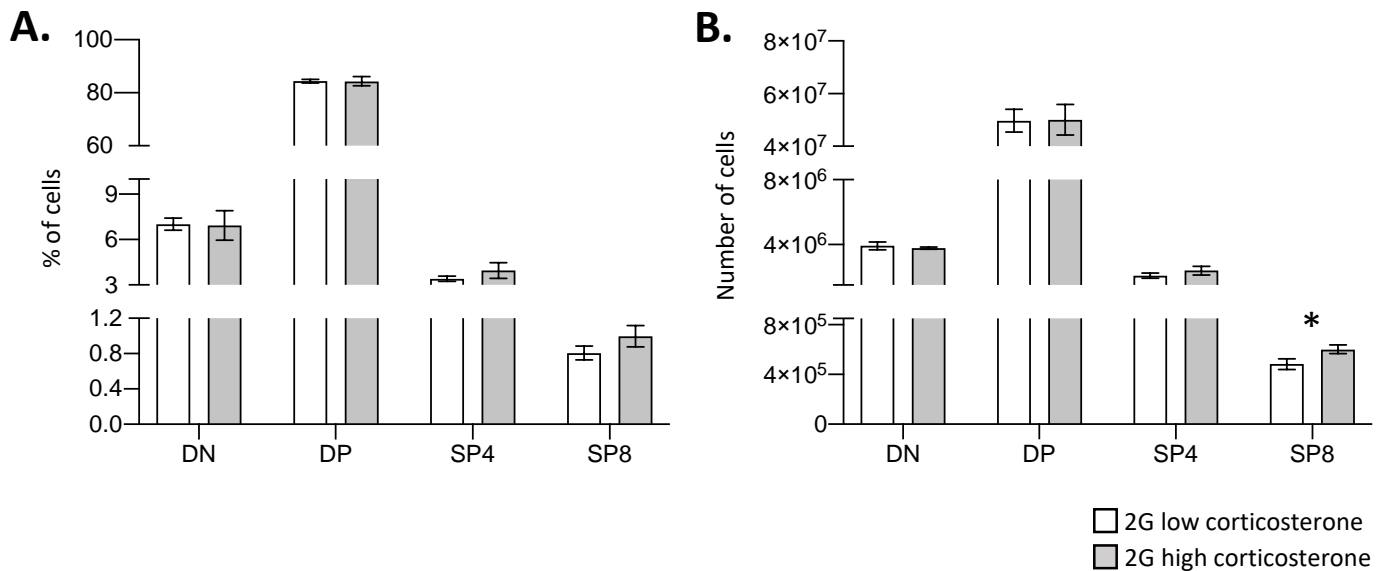
Supplementary Figure S1. Gates designed to analyze thymocyte subpopulations in control (1G) and hypergravity (2G) mice. Thymocytes were identified by flow cytometry. (A, B) Double positive (DP) and single positive (SP) subpopulations were identified using CD4, CD8, CD3 and TCR staining. (C) To ensure that DN are not contaminated by mature T-cells, we analyzed CD3 and TCR staining in this population.

Figure S2



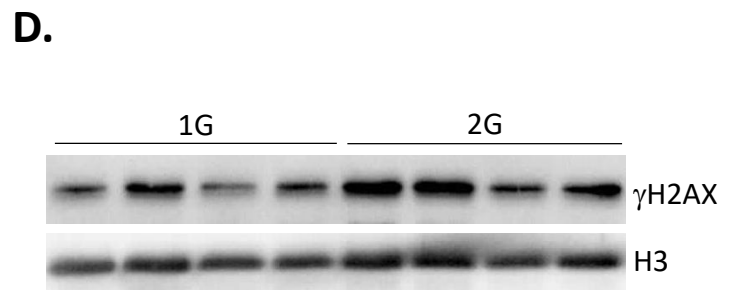
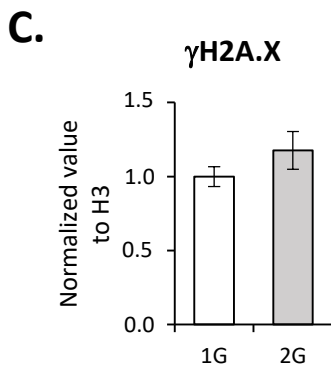
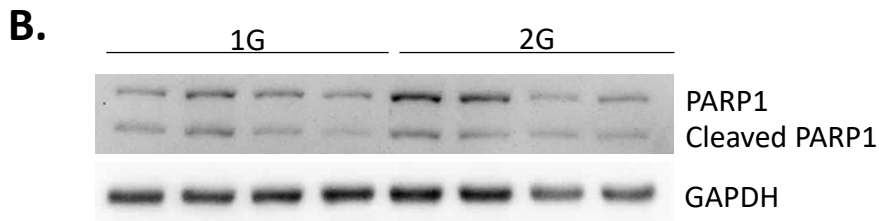
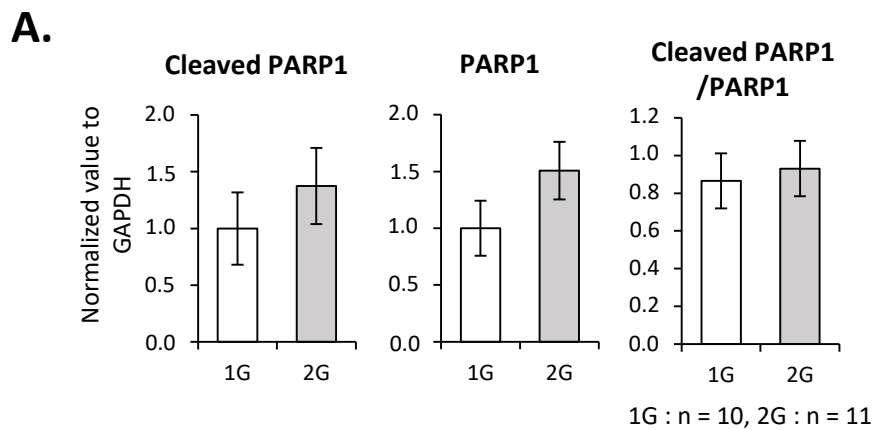
Supplementary Figure S2. Serum corticosterone concentrations in 1G and 2G mice measured by ELISA. Each dot corresponds to one mice. Mean is indicated as a black line. Mann-Whitney test was used to reveal statistically significant differences.

Figure S3



Supplementary Figure S3. *T* lymphopoiesis is not affected by serum corticosterone concentration observed in 2G mice. 2G mice were subdivided in two groups, one with normal serum corticosterone concentration (n=7) and one with higher serum corticosterone concentration (n=3). Analysis of *T* lymphopoiesis by flow cytometry. *T*-cell subpopulations were identified using CD4, CD8, CD3, TCR staining. For each mouse, staining was done in duplicate and mean was calculated. (A) Percentage of each subpopulation. (B) Absolute number of cells in each subpopulation. Data are mean \pm SEM. t-tests were used to reveal statistically significant differences. * $p < 0.05$.

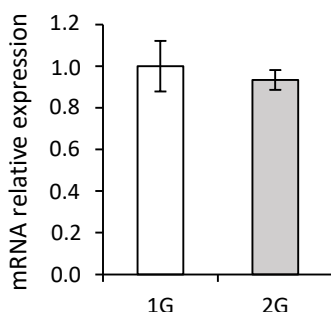
Figure S4



1G : n = 19 / 2G : n = 18

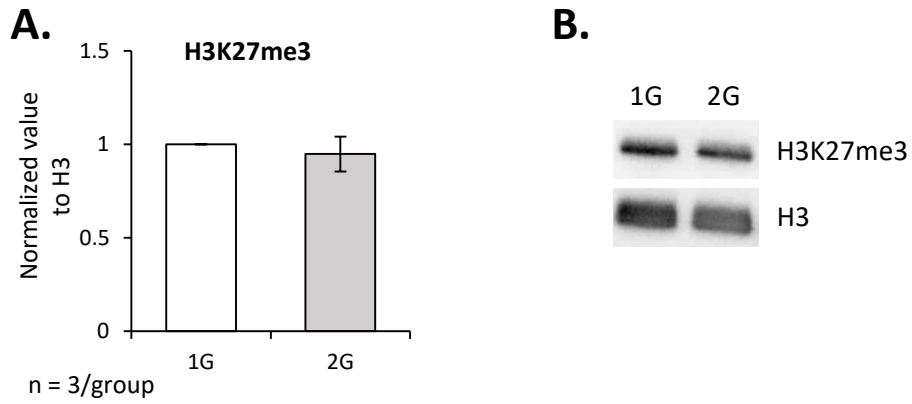
Supplementary Figure S4. 2G exposure does not affect PARP1 cleavage and γ H2A.X level. (A and B) Evaluation of thymocyte apoptosis via PARP1 cleavage detected by Western blotting. (A) Graphs presenting the quantification of cleaved PARP1 and PARP1 normalized to GAPDH. (B) Representative Western blot obtained with 4 mice in each group. (C and D) Evaluation of thymocyte DNA double strand break via γ H2A.X level measured by Western blotting. (C) Graph presenting the quantification of γ H2A.X normalized to H3. (D) Representative Western blot obtained with 4 mice in each group. Data are mean \pm SEM. t-test or Mann-Whitney test did not reveal statistically significant differences.

Figure S5



Supplementary Figure S5. The transcription level of Cyclin D1 is not affected by hypergravity. mRNA levels of Cyclin D1 were quantified using quantitative real-time PCR and normalized to three housekeeping transcripts (*Ppia*, *Eif3f*, *Rpl13a*). Data are the means \pm SEM of 8 mice per group. t-test did not reveal a statistically significant difference.

Figure S6



Supplementary Figure S6. 18h of 2xg hypergravity does not impact H3K27me3 level in the SCIET27 cell line. H3K27me3 level was evaluated by Western blotting. (A) Graph presenting the quantification of H3K27me3 normalized to H3. (B) Representative Western blot. Data are mean \pm SD. t-test was used to reveal statistically significant differences.

Figure S7

A.



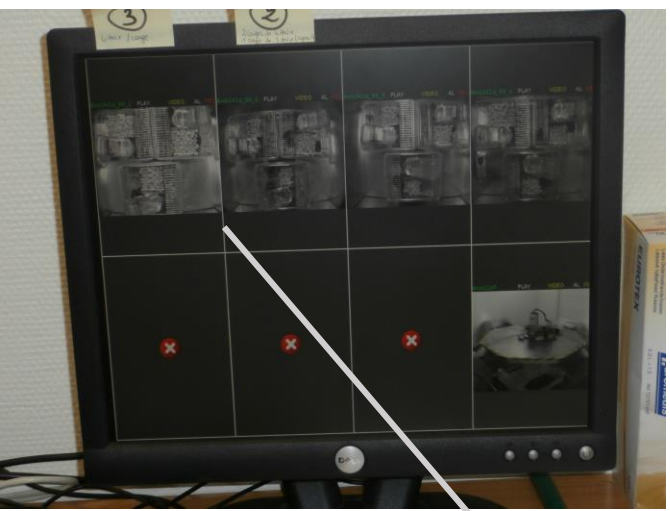
B.



Supplementary Figure S7. Mice hypergravity exposure. The experimental setting includes the centrifuge (A), the control box (B) and the monitoring system (C).

Figure S8

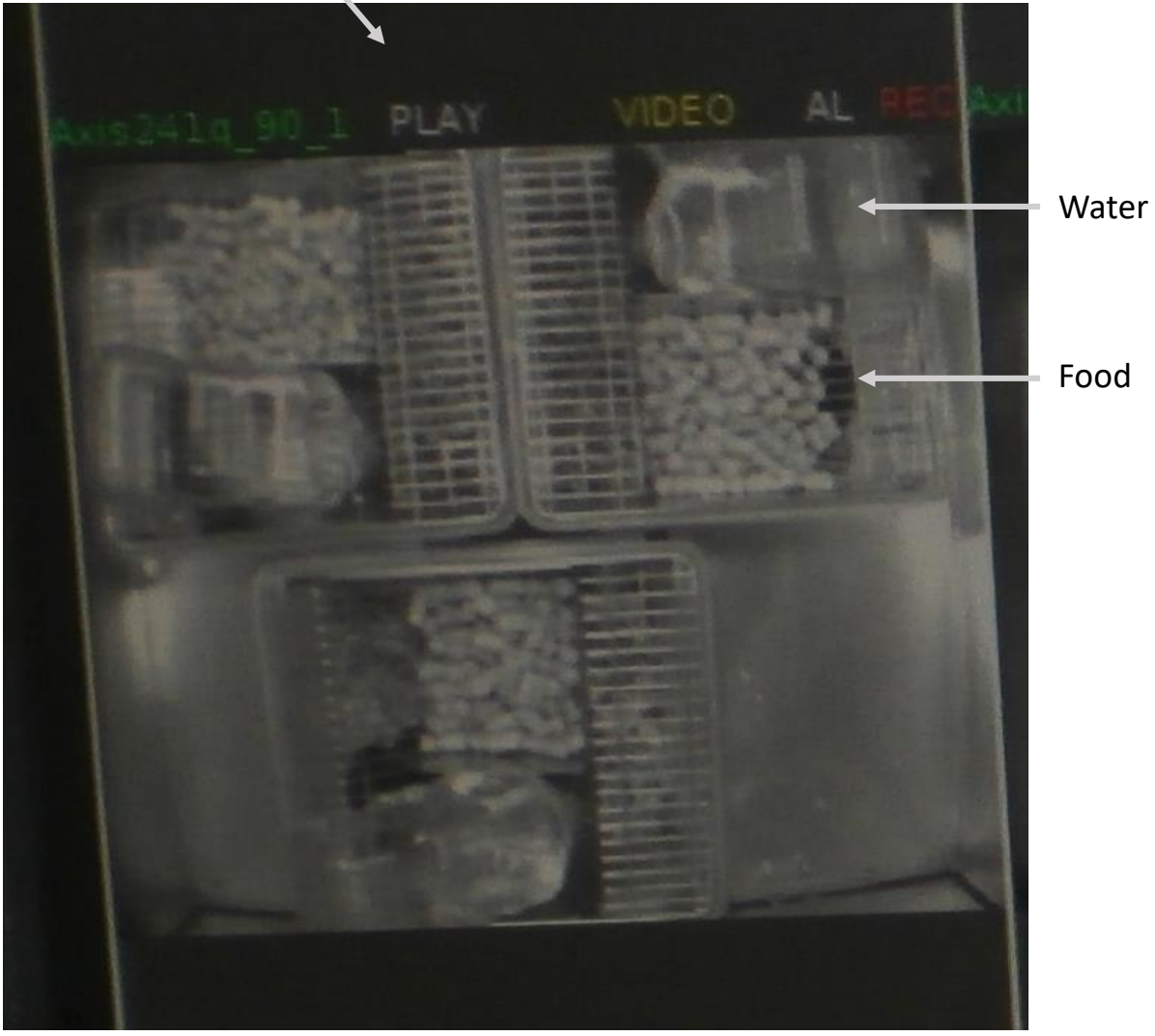
A.



C.



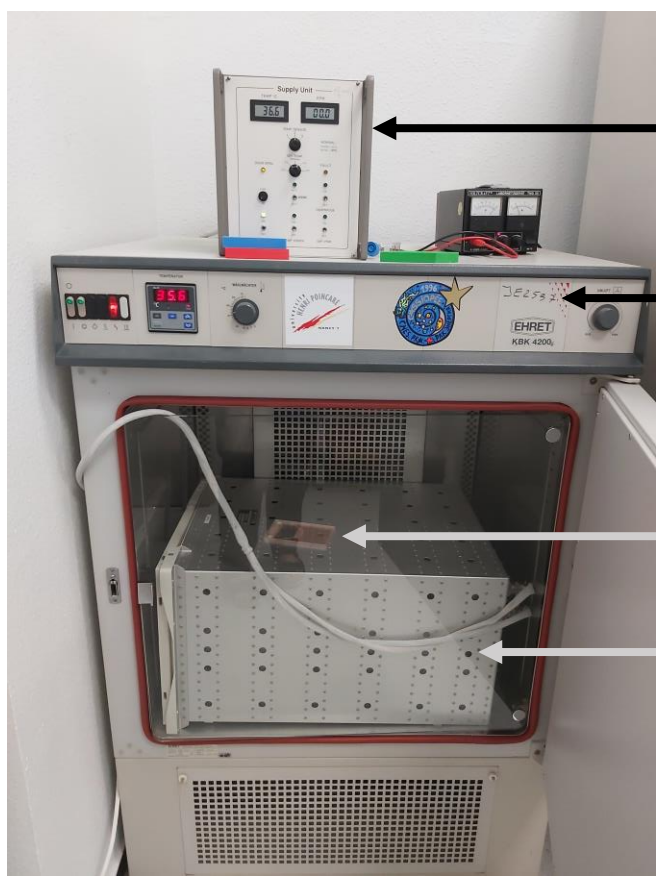
B.



Supplementary Figure S8. *Mice monitoring during hypergravity exposure.* (A) Picture of the computer screen allowing mice monitoring during centrifugation via a camera placed in each gondola. Each rectangle corresponds to one gondola. (B) Zoom on a rectangle shown in A. Up to three cages containing food and water can be placed in a gondola. (C) Picture of mice, taken 5 minutes after the end of hypergravity exposure.

Figure S9

A.



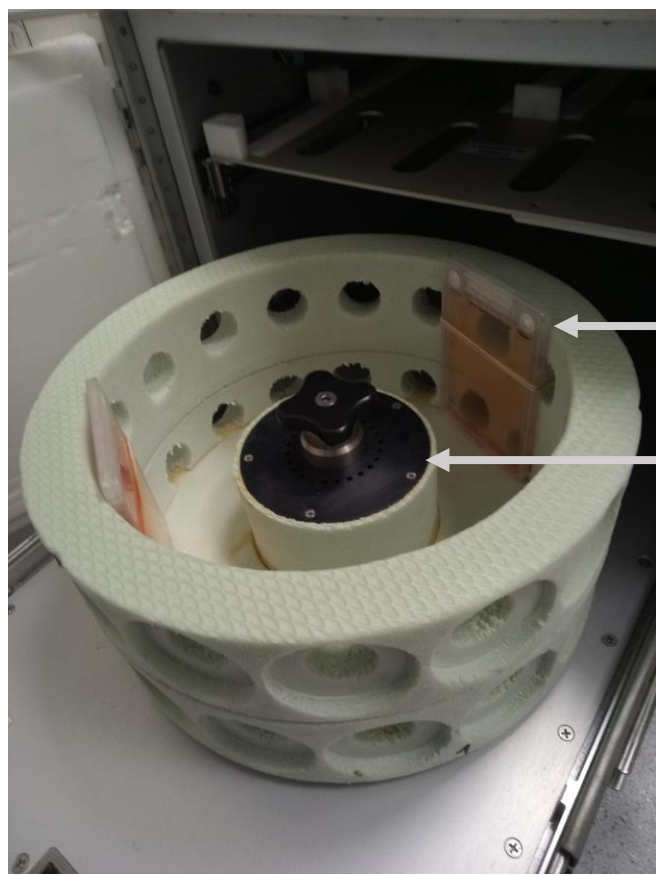
Centrifuge monitoring

Incubator

Petaka®G3 control

Centrifuge

B.



Cells cultivated in Petaka®G3

Rotor (the distance between the axis of the centrifuge and Petaka®G3 is 10.5 cm)

Supplementary Figure S9. Hypergravity exposure of the SCIET27 cell line. (A) Picture of the centrifuge placed in an incubator set at 37°C. A Petaka®G3 cell culture chamber was placed on the centrifuge as 1xg control. (B) Picture of rotor with two Petaka®G3 cell culture chambers.

Table S1. Antibodies, reagents and cell line used in this study.

Product	Target	Conjugate	Clone	Cat#	Supplier
Antibody	CD4	PE	RM4-5	100511	Biolegend (Ozyme, FR)
	CD8a	PECy7	53-6.7	100721	
	TCR β	FITC	H57-597	109205	
	CD3	APC	17A2	100235	
	GAPDH	-	-	G9545	Merck Millipore (FR)
	EZH2	-	-	07-689	
	EED	-	AA19	05-1320	
	H3K27me3	-	-	07-449	
	H3K4me2	-	-	07-030	
	H3K9ac	-	-	07-352	
	Suz12	-	D39F6	3737	
	H3K9panmethyl	-	-	4069	Active Motif (BE)
	γ H2A.X	-	-	39118	
	H3 C-terminal	-	-	39164	
	PARP1	-	-	GTX100573	Gentex (USA)
GSK126 inhibitor	EZH2	-	-	NDH49A	Interchim (FR)
SCIET27 cell line	SCIET27 is not a commercial cell line. It was kindly provided by I. Screpanti (Laboratory of Molecular Pathology, Sapienza University of Rome) and I. Aifantis (New York University, School of Medicine).				

Annexe 2

Revue : Gravitational Experimental Platform for Animal Models, a New Platform at ESA's Terrestrial Facilities to Study the Effects of Micro- and Hypergravity on Aquatic and Rodent

Animal Models

*J. Bonnefoy, S. Ghislin, J. Beyrend, F. Coste, **G. Calcagno**, I. Lartaud, G. Gauquelin-Koch, S. Poussier and J.-P. Frippiat*



Review

Gravitational Experimental Platform for Animal Models, a New Platform at ESA's Terrestrial Facilities to Study the Effects of Micro- and Hypergravity on Aquatic and Rodent Animal Models

Julie Bonnefoy ^{1,*} , Stéphanie Ghislin ¹, Jérôme Beyrend ², Florence Coste ¹, Gaetano Calcagno ¹, Isabelle Lartaud ², Guillemette Gauquelin-Koch ³, Sylvain Poussier ² and Jean-Pol Frippiat ^{1,*}

¹ Stress, Immunity, Pathogens Laboratory, SIMPA, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; stephanie.ghislin@univ-lorraine.fr (S.G.); florence.coste@univ-lorraine.fr (F.C.); gaetano.calcagno@univ-lorraine.fr (G.C.)

² Animalerie du Campus Biologie Santé, ACBS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; jerome.beyrend@univ-lorraine.fr (J.B.); isabelle.lartaud@univ-lorraine.fr (I.L.); sylvain.poussier@univ-lorraine.fr (S.P.)

³ Life Sciences in Microgravity, French National Space Agency, CNES, F-75001 Paris, France; guillemette.gauquelin@cnec.fr

* Correspondence: julie.bonnefoy@univ-lorraine.fr (J.B.); jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr (J.-P.F.)



Citation: Bonnefoy, J.; Ghislin, S.; Beyrend, J.; Coste, F.; Calcagno, G.; Lartaud, I.; Gauquelin-Koch, G.; Poussier, S.; Frippiat, J.-P. Gravitational Experimental Platform for Animal Models, a New Platform at ESA's Terrestrial Facilities to Study the Effects of Micro- and Hypergravity on Aquatic and Rodent Animal Models. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2961. <https://doi.org/10.3390/ijms22062961>

Academic Editor: Natalia Battista

Received: 22 February 2021

Accepted: 13 March 2021

Published: 15 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Using rotors to expose animals to different levels of hypergravity is an efficient means of understanding how altered gravity affects physiological functions, interactions between physiological systems and animal development. Furthermore, rotors can be used to prepare space experiments, e.g., conducting hypergravity experiments to demonstrate the feasibility of a study before its implementation and to complement inflight experiments by comparing the effects of micro- and hypergravity. In this paper, we present a new platform called the Gravitational Experimental Platform for Animal Models (GEPAM), which has been part of European Space Agency (ESA)'s portfolio of ground-based facilities since 2020, to study the effects of altered gravity on aquatic animal models (amphibian embryos/tadpoles) and mice. This platform comprises rotors for hypergravity exposure (three aquatic rotors and one rodent rotor) and models to simulate microgravity (cages for mouse hindlimb unloading and a random positioning machine (RPM)). Four species of amphibians can be used at present. All murine strains can be used and are maintained in a specific pathogen-free area. This platform is surrounded by numerous facilities for sample preparation and analysis using state-of-the-art techniques. Finally, we illustrate how GEPAM can contribute to the understanding of molecular and cellular mechanisms and the identification of countermeasures.

Keywords: gravity; spaceflight; development; adaptation; amphibian; mice

1. Introduction

Space is an adverse environment in which humans and animals face a combination of stressors (e.g., hypergravity during take-off and landing, microgravity throughout the flight, solar and cosmic radiation, confinement, isolation, sleep deprivation, disrupted circadian rhythm) that induce physiological dysregulations, such as muscle atrophy, cardiovascular dysfunction, bone demineralization, impaired cognitive processes, ocular problems, and reduced immunological competence [1].

Mechanical unloading elicits reductions in muscle mass, strength, and function, which upon return to Earth result in reduced function and performance [2]. An acute syndrome called cardiovascular deconditioning, associating orthostatic intolerance with syncope, and an increase in resting heart rate and a decrease in physical capability occur after spaceflight [3]. Microgravity has been shown to decrease heart rate and arterial pressure [4].

This was confirmed by another study reporting a misaligned diurnal rhythm of the heart rate during a flight [5].

Another major form of damage observed in humans and mice during spaceflight is bone loss due to an imbalance between bone formation and bone resorption [6–10]. Weight-bearing bones such as the femur, tibia, and vertebrae are more affected than non-weight-bearing bones. This might result in an increased risk of fractures [11]. Bone loss was also observed in zebrafish larvae subjected to simulated microgravity, whereas increased bone formation was noted when they were subjected to a 3-g hypergravity level [12,13].

The vestibular system, which functions to maintain body equilibrium, is affected by exposure to altered gravity [14]. Disruption of gravitational perception can lead to space motion sickness (pallor, cold, sweat, nausea, dizziness, vomiting), which is often felt transiently by astronauts. A decreased otolith-mediated vestibular response was noted after long-duration spaceflight in astronauts [15]. The vestibular system of fish is also affected, as it has been shown that otolith size and growth rate are increased under simulated microgravity [16]. Tadpoles that were flown shortly before the first appearance of the roll-induced vestibulo-ocular reflex (rVOR), a type of utriculo-ocular reflex that is specifically related to gravity, presented a depressed rVOR, whereas those launched after the first appearance of rVOR experienced an augmentation of that reflex [17], indicating that vestibular development is impaired by altered gravity [18].

Regarding the immune system, it has been demonstrated that dysregulation occurred and persisted during a 6-month orbital spaceflight [19,20]. A recent study revealed that approximately 50% of astronauts who spent six months onboard the International Space Station (ISS) faced immunological problems (e.g., infections, hypersensitivities) [21], thereby confirming in-flight dysregulation distinct from the influences of landing and readaptation following deconditioning [19,21,22]. Both the innate and adaptive compartments of the human and murine immune systems are negatively affected by space conditions (reviewed in [23–26]). The immune system of amphibians is also affected, as it has been shown that the production of their antibodies is altered [27–29]. Moreover, the use of tadpoles has led to the discovery of the perturbation of B-cell differentiation under spaceflight conditions [30], an observation that was confirmed in mice subjected to simulated microgravity [31] or real spaceflight conditions [32]. This observation was confirmed in cosmonauts [33].

These alterations in key functions show that spaceflight-induced physiological changes must be thoroughly investigated and understood to preserve astronaut health to safely and effectively accomplish the physically demanding goals of missions, especially during future deep-space exploration missions, such as the deployment of a lunar station, followed by multiple Mars flyby missions. These data also show that, in addition to mice, lower vertebrates, such as small fish species and tadpoles, can contribute to addressing human health questions. These animals are excellent models for developmental and biomedical research [34–43]. In addition, lower vertebrates meet many technical requirements associated with spaceflight experiments: their size and weight are reduced, many of them can be housed in a reduced volume, and they are easier to raise than mice.

Because space research is limited by access to the ISS, limited crew time, and various technical constraints, ground-based facilities are needed to investigate the effects of stressors encountered during space missions. Furthermore, ground-based facilities allow the isolation of single aspects of the space environment on Earth and make space research more accessible. They allow controlled experiments to be carried out with statistical power, in which the effect of one parameter (e.g., an alteration of gravity) can be analyzed without the interference of other parameters (e.g., radiation). Subjecting animals to ground-based models is invaluable in space research, as it can easily allow the evaluation of short-, medium-, and long-term effects.

In this paper, we present a new platform, which is part of the European Space Agency (ESA)'s terrestrial facilities and is accessible to the scientific community, for exposing amphibian embryos, tadpoles, or mice to modified gravity conditions, and we illustrate, using the immune and musculoskeletal systems as examples, how it can help to unveil

molecular and cellular mechanisms developed in response to gravitational changes (see Figure 1 of Hariom et al. [1] for a recent summary of the effects of micro- and hypergravity on physiological systems). This platform can contribute to gathering useful information for the preparation of future manned space exploration missions through the analysis of mechanisms and signaling pathways preserved during the evolution of jawed vertebrates (gnathostomes). The availability of space hardware is of particular interest to prepare future space experiments (see Section 8 if you wish to use facilities of the Gravitational Experimental Platform for Animal Models (GEPAM) platform).

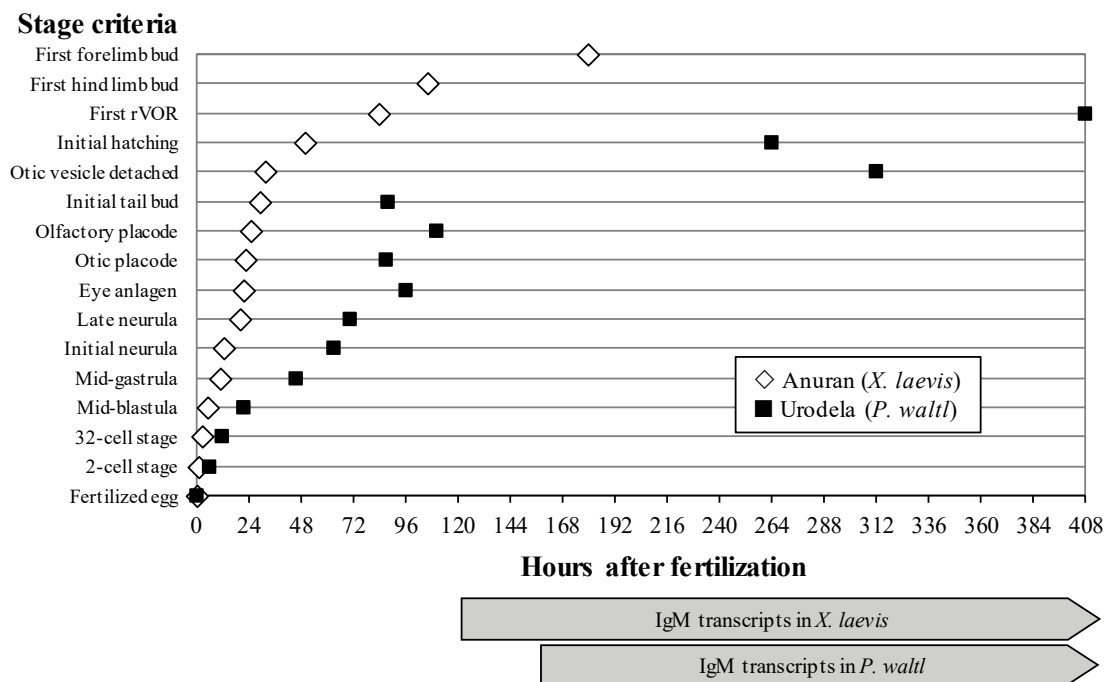


Figure 1. Comparison of anuran and urodela embryo developmental rates using *X. laevis* and *P. waltl* as examples. Gray arrows indicate the expression of IgM heavy-chain transcripts in both species. rVOR: vestibuloocular reflex. Adapted from [18,44] with the permission of Elsevier Ltd. and John Wiley and Sons.

2. Equipment Available in the GEPAM Platform

2.1. Aquatic Rotors

Small aquatic animal models can perceive gravity changes, as evidenced by behavioral changes, alterations in bone formation, and in several pathways involved in bone, muscle, immune, or cardiovascular development [12,13,30]. Three aquatic rotors are available in the conventional sector of the Animalerie Campus Biologie Santé (ACBS, the animal facility of the biology and health campus) animal department to expose the embryos or tadpoles of four amphibian species (*Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*, *Ambystoma mexicanum*, *Pleurodeles waltl*) to different levels of hypergravity. The species is chosen according to the biological process to be studied. Indeed, anuran embryos (*X. laevis* and *X. tropicalis*) develop much more quickly than urodela embryos (*P. waltl* and *A. mexicanum*) (Figure 1). Thus, urodela embryos can be used to study effects on processes occurring at early stages of development, whereas anuran embryos can be used to analyze effects on later stages of development.

The first aquatic rotor (Figure 2) has eight gondolas, each accommodating an aquarium (155 × 85 × 74 mm) that can contain up to 0.5 L of water. Five levels of hypergravity are possible (1.5, 2, 3, 4, and 5 g). During hypergravity exposure, aeration of water by bubblers, food provision by a computer-controlled distribution system, temperature, lighting and ventilation are controlled. Furthermore, embryos/tadpoles are monitored by cameras operating both in visible and infrared light. The water level is checked regularly, and the water lost through evaporation is replaced.

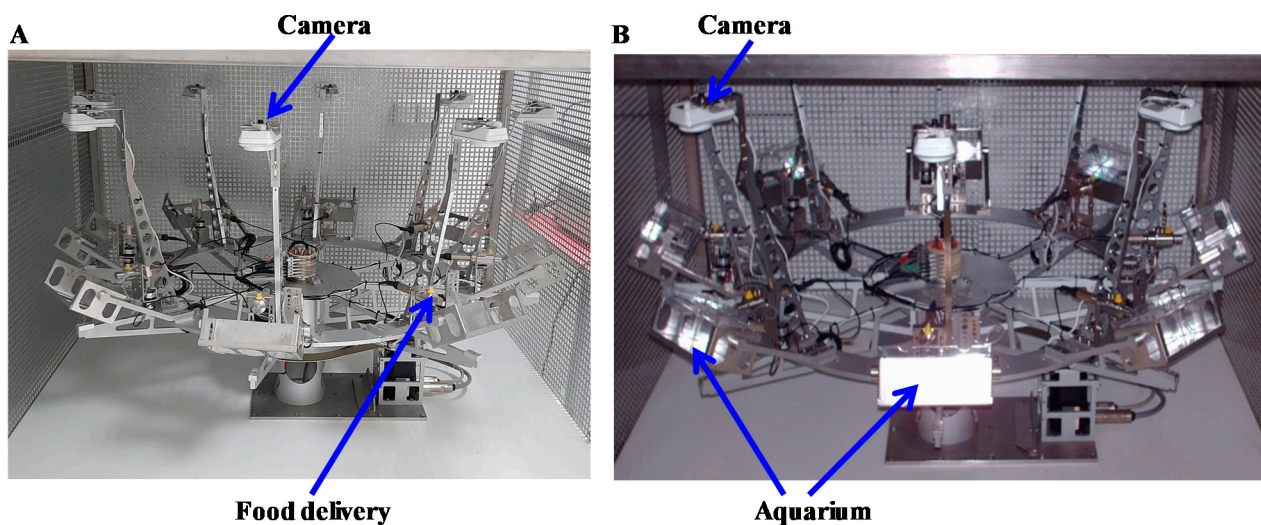


Figure 2. Rotor allowing the centrifugation of eight 0.5-L aquariums. (A) Centrifuge without aquariums in gondolas. (B) Centrifuge with the aquariums.

The second aquatic rotor (Figure 3) can accommodate eight miniaquariums, allowing the development of amphibian embryos onboard the ISS up to developmental stages requiring feeding [45]. Five levels of hypergravity are possible (1.5, 2, 3, 4, and 5 g). Each miniaquarium contains 64 mL of water. Aeration is ensured by the fact that both large sides are covered by a transparent air-permeable membrane. These membranes, which are impermeable to H₂O, prevent evaporation losses. In addition, each miniaquarium has a circulation of water provided by a pump that allows the disposal of waste by the passage of water through a filter. Food is gradually provided to the animals of each miniaquarium from a tank driven by an osmotic pump. Here, animal surveillance is visual and carried out daily. Temperature, lighting, and ventilation are controlled during hypergravity exposure.

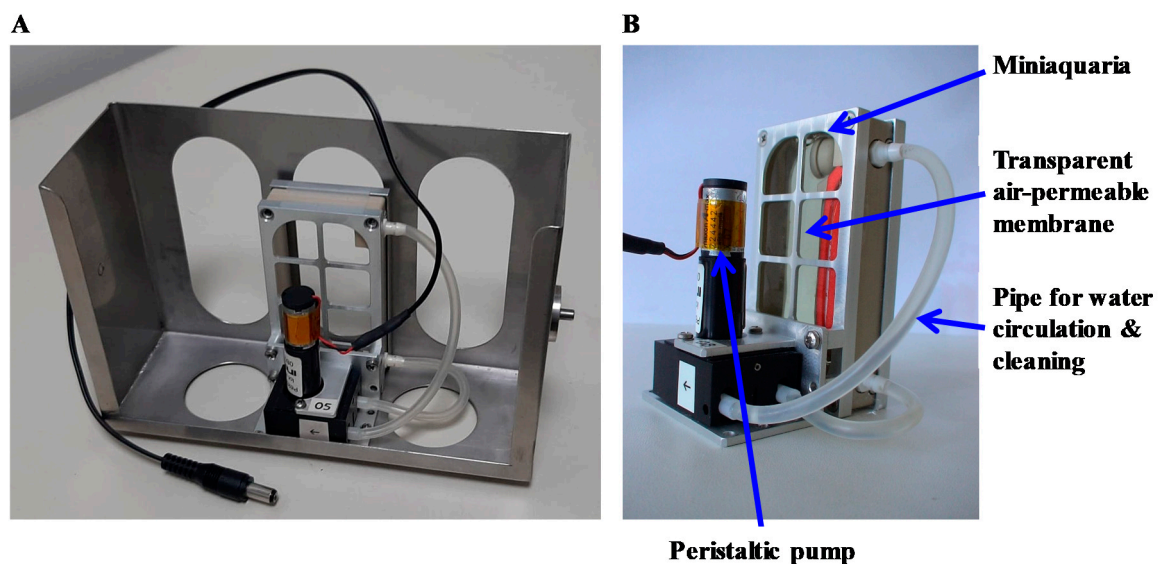


Figure 3. (A) Gondola of the rotor allowing the centrifugation of eight miniaquariums. (B) Miniaquariums have both large sides covered with transparent air-permeable membranes. These miniaquariums have a water circulation loop provided by a peristaltic pump with waste removal by an activated carbon filter and an osmotic pump that delivers the food. Each miniaquarium is 80 mm long, 40 mm wide, and 20 mm high.

The third aquatic rotor (Figure 4) allows us to subject ten miniaquariums to a hypergravity level of 3 g; these miniaquariums have been designed to allow the development of amphibian embryos onboard the ISS up to food intake. These miniaquariums are used

to study the effects of altered gravity on early developmental stages in which food is not needed because embryos use their yolk as a food source. Each miniaquarium has a capacity of 64 mL of water. As with the other type of miniaquarium, aeration is provided by transparent membranes that are permeable to air but impermeable to water. Temperature and aeration are controlled in the room in which the rotor is located. There is no lighting system in the container housing this rotor. If lighting is required or if other levels of hypergravity are required, these miniaquariums without a food distribution system can be placed in the gondolas of the first aquatic rotor (Figure 2).

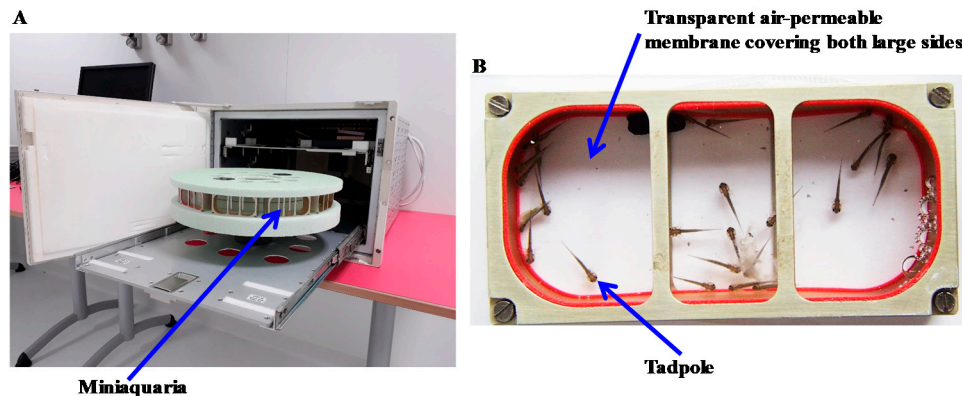


Figure 4. (A) Rotor allowing the centrifugation of 10 miniaquariums without a food supply and a water cleaning system. (B) Each miniaquarium is 80 mm long, 40 mm wide, and 20 mm high and has two transparent faces that are permeable to O_2 and CO_2 but impermeable to H_2O . In (B), amphibian tadpoles can be seen.

Figure 5 shows good survival rates of anuran and urodela amphibian embryos or tadpoles raised under different levels of hypergravity using the devices present in the GEPAM platform. However, as shown in Figure 5A, if an experiment requires working with very early stages of development, it is necessary to carefully ensure correct fertilization before starting an experiment, as this may reduce the number of live tadpoles at the end of the protocol.

2.2. Random Positioning Machine (RPM)

A desktop random positioning machine from Dutch Space BV (Figure 6) is available to subject embryos, placed in miniaquariums without a food supply and a water cleaning system, to simulated microgravity. One to two miniaquariums can be mounted in this machine, which will randomly rotate them around the Earth's gravity vector, resulting in an average net force close to zero, therefore simulating microgravity. Temperature, lighting, and ventilation are controlled in the room hosting this machine. This machine can also be placed in a cell culture incubator to subject cells to simulated microgravity.

2.3. Rodent Rotor

A large-radius rodent rotor (Figure 7) is available in the specific pathogen-free sector of the ACBS animal facility. This centrifuge has four $55 \times 38 \times 30$ cm (L \times W \times H) gondolas into which cages containing mice can be placed (typically four mice per cage). The speed can be adjusted to any desired g-level up to a maximum of 4 g. Mice can be supplied with enough food and water for three weeks so that the centrifuge can operate continuously during this period. Shorter exposures are possible, as well as longer exposures (>3 weeks after cleaning the cage, replenishing food and water). Each gondola contains an on-demand programmable lighting system and a camera (working in the visible and infrared light ranges) allowing remote control, day and night, of the mice in their cages. Environmental variables such as temperature, humidity, and ventilation are controlled in the room that houses this rotor. Four control gondolas are available. They are placed in a static position

in the room containing the rotor to ensure that all environmental parameters, with the exception of the gravity level, are the same as in the centrifuge.

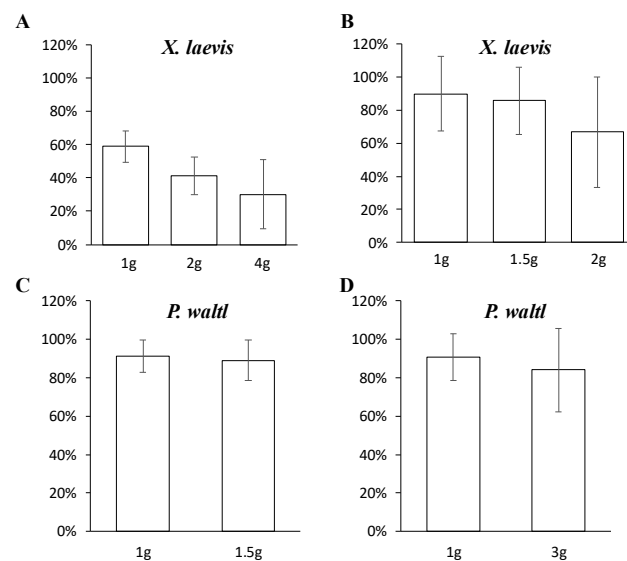


Figure 5. Examples of survival rates of anuran and urodela embryos, or tadpoles, raised under different levels of hypergravity for different durations. **(A)** Survival rates of *X. laevis* after 3 weeks of development at 2 or 4 g by comparison to 1 g controls. Embryos were at stage 8 of development at the beginning of the experiment (~5 h post-fertilization). **(B)** Survival rates of *X. laevis* after 2 weeks of development at 1.5 or 2 g by comparison to 1 g controls. Embryos were at stages 55–60 of development at the beginning of the experiment (~32–46 days post fertilization). **(C)** Survival rates of *P. waltl* after 10 days of development at 1.5 g by comparison to 1 g controls. Embryos were at stages 19–20 of development at the beginning of the experiment (~77 h post fertilization). **(D)** Survival rates of *P. waltl* after 10 days of development at 3 g by comparison to 1 g controls. Embryos were at stages 19–20 of development at the beginning of the experiment (~77 h post-fertilization). Aquariums containing 0.5 L of water and rotor 1 (Figure 2) were used to obtain the results presented in panels **(A,B)**. Miniaquariums without a food supply and a water cleaning system and rotor 3 (Figure 4) or rotor 1 (Figure 2) were used to obtain the results presented in panels **(C,D)**. No statistically significant differences could be detected. Lower survival rates are observed in panel **(A)** because embryos were not selected before initiating the experiment. Consequently, some unfertilized eggs were included.

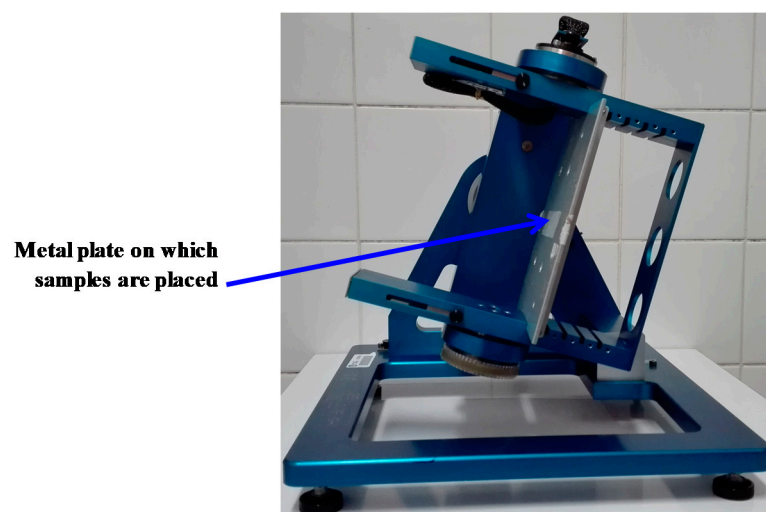
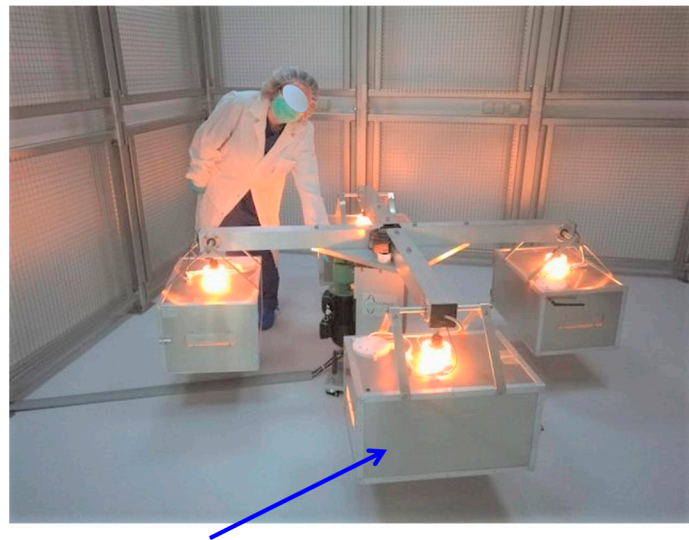


Figure 6. Picture of the random positioning machine (RPM), allowing the exposure of amphibian embryos or tadpoles to simulated microgravity.



Gondola equipped with a lighting system and a camera

Figure 7. Large-radius rodent rotor allowing the exposure of mice to any desired g-level up to a maximum of 4 g.

2.4. Cages for Mouse Hindlimb Unloading

Hindlimb unloading (HU) is a model frequently used to simulate the effects of microgravity [46]. Hindlimb-unloading cages (35 cm deep \times 15 cm wide \times 26 cm high), manufactured according to [47], are available in the specific pathogen-free sector of the ACBS animal facility. In these cages, mice are suspended using a dressing retention sheet wrapped around the tail and a wire hooked to a swivel-pulley system. The swivel pulley glides along two stainless steel rods that run the full length of the cage, providing a full 360° range of movement. The suspension angle is 25°–30°, so that only the forelimbs touch the grid at the bottom of the cage. Two types of controls can be performed: control mice housed in standard cages (35 cm deep \times 15 cm wide \times 14 cm high) and orthostatically restrained mice. In this last group, the mice are attached by the tail, but all four limbs are allowed to be in full contact with the floor of the suspension cage.

3. Housing Conditions

The ACBS animal facility (agreement number C54-547-30), with a surface area of 2700 m², offers a high level of services and allows the breeding and maintenance of animals either under conventional conditions or in a rodent-specific pathogen-free area. ACBS meets the best technical standards in terms of housing and experimentation, in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals in compliance with the Replacement, Reduction, and Refinement (3Rs) requirements for animal welfare. ACBS is also involved in a quality assurance process attested by the obtention, in 2019, of the StAR-LUE label (Structure d'Appui à la Recherche—Lorraine Université d'Excellence (Research Support Structure—Lorraine University of Excellence)). This high-tech infrastructure can accommodate up to 3500 rodent cages and ~30 genetically modified mouse strains. Environmental variables such as temperature, humidity, ventilation, and pressure gradient versus corridors (in order to maintain animal health status) are controlled independently for each room of the murine and aquatic sectors.

The amphibian housing area (Figure 8) is located a few meters from the aquatic rotors. Amphibian housing conditions meet the physiological and behavioral requirements of these species. Water quality is monitored twice a week. Temperature is monitored daily, as well as feeding behavior and the appearance of possible symptoms. In addition, food and water quality have been harmonized with those of a major producer of *X. laevis* and *X. tropicalis* in France to facilitate the acclimatization of the animals upon their arrival at ACBS.

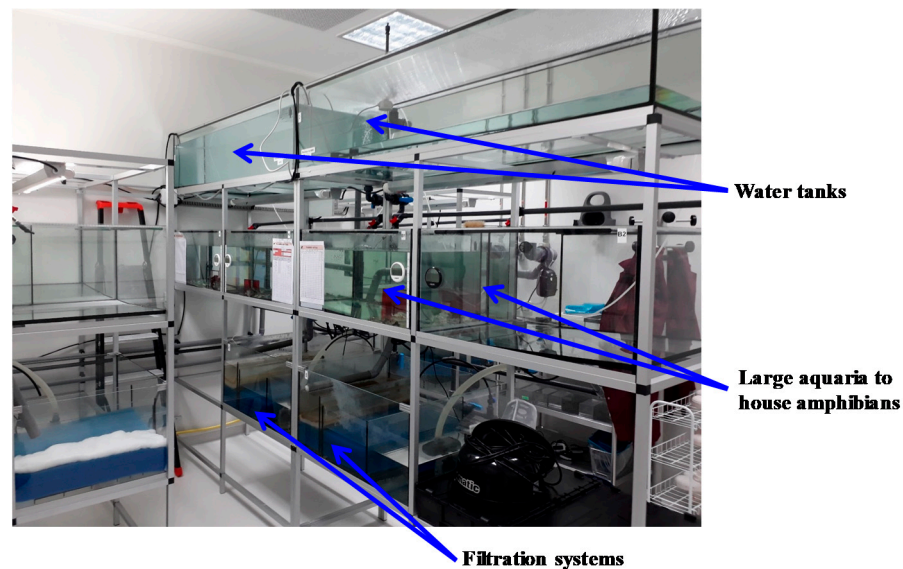


Figure 8. Amphibian housing area of the ACBS animal facility. Both adults and embryos/tadpoles can be reared in this sector under controlled conditions.

4. Relevance to ESA's Space Exploration Program

Exposing amphibians and/or mice to modified gravity can help answer several questions identified as of importance in ESA roadmaps (http://esamultimedia.esa.int/docs/HRE/SciSpace_Roadmaps.pdf, accessed on 13 March 2021), such as:

How are the structure and function of cells and tissues influenced by gravity, and what are the gravity perception mechanisms? This will involve, for example, identifying changes in the mechanical properties of individual cells, tissues, and model organisms in response to altered gravity; assessing the effects of altered gravity on epigenetic, genetic and repair mechanisms; and studying stress responses induced by altered gravity conditions and their consequences.

How do gravity alterations affect animal systems at the cell or tissue level? This will involve studying the effects of microgravity and hypergravity at the molecular and cellular levels on the development, response, and regulation of the immune, musculoskeletal, cardiovascular, and central nervous systems and other physiological systems, such as gut microbiota, and tissue regeneration and healing in animal models.

How can an integrated picture of the molecular networks involved in adaptation to gravity changes in different biological systems be obtained? To answer this question, it will be necessary to compare different cell types in the same organism and/or a single cell type in different organisms, for example, by applying-omics approaches. Addressing this question is key to allowing the development of countermeasures.

5. How Can GEPAM Contribute to the Understanding of Molecular and Cellular Mechanisms?

There are numerous transgenic and mutant lines and strains of mice, *Xenopus* and zebrafish, as well as animal models of human diseases (see [48–50] for more details). GEPAM can allow the exposure of these various models to gravity changes from which cells and tissues can be extracted and analyzed on-site, using advanced molecular and cellular techniques (e.g., flow cytometry, cell sorting, imaging, epitranscriptomics, high-throughput sequencing, and proteomics (see [51])) to gain fundamental knowledge about the effects of gravity changes on physiological systems and their interactions. For example, immunocompetent cells are derived from hematopoietic stem cells (HSCs) that reside in the bone marrow within specialized niches made up of bone and vascular structures, and interactions between HSCs and their niches control the balance between quiescence, self-renewal, and differentiation of HSCs [52]; the sympathetic nervous system and the

hypothalamic–pituitary–adrenal axis are strongly involved in the brain–gut axis that drives communication between the central nervous system and the gastrointestinal tract, including microbiota [53]. In addition, models of human disease can contribute to the understanding of the genetic and genomic basis of human biology, health, and disease.

Here are some examples of results obtained using tools such as those of the GEPAM platform. Exposure of *Pleurodeles waltl* embryos to simulated microgravity (RPM) or hypergravity (3 g) until hatching revealed that the amount of IgM heavy-chain transcripts is higher at 3 g and lower at 10^{-2} – 10^{-3} g by comparison to 1 g controls [30]. A lower expression of Ikaros mRNAs, essential for establishing a lymphoid transcriptional program [54], was also noted in microgravity larvae, thereby suggesting that B-lymphopoiesis may be sensitive to gravity changes, an observation that was later confirmed in mice subjected to simulated microgravity [31] and real spaceflight conditions [32] and was also confirmed in cosmonauts [33]. An upregulation of NF- κ B transcripts was also noted in hypergravity larvae, whereas a downregulation of these mRNAs was observed in larvae developed in the RPM, thereby showing that this signaling pathway is gravity-sensitive. The same conclusion was deduced from other studies, although the cell type determines whether the NF- κ B pathway is activated or inhibited [55–59], as confirmed by a recent review [60]. These data show that NF- κ B is commonly affected across many different cell types of different species under true or simulated spaceflight conditions (Figure 9). The adverse effect of spaceflight on B lymphopoiesis and the gravity sensitivity of the NF- κ B pathway, involved in inflammation, T- and B-cell development, and responses to pathogens [61], may contribute to explaining the increased susceptibility to infection during space missions.

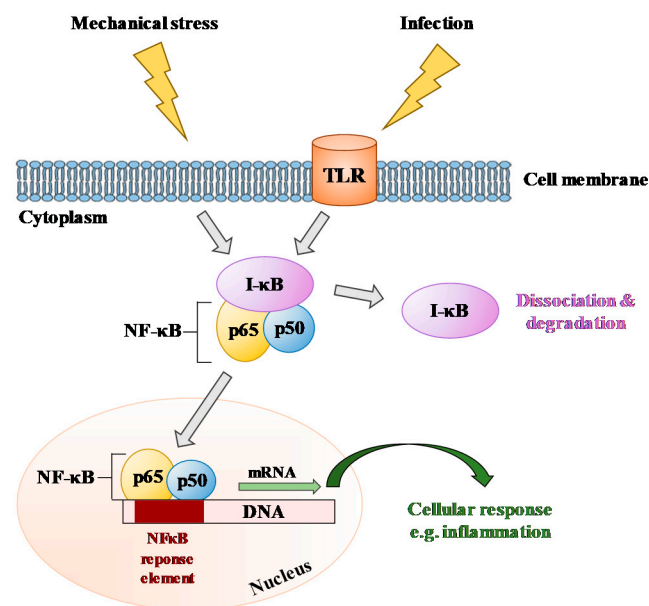


Figure 9. Schematic presentation of a major signaling pathway frequently affected in many different cell types of different species in response to altered gravity, mechanical stress, or infection. NF- κ B: nuclear factor-kappa B; I- κ B: inhibitor of κ B; TLR: Toll-like receptor.

The development of *P. waltl* larvae under simulated microgravity or simulated microgravity and perturbed circadian rhythm also revealed modifications of the amounts of complement component 3 (C3) mRNAs and/or proteins, suggesting that complement expression can be modified under real spaceflight conditions, potentially increasing the risk of inflammation [62] and contributing to a better understanding of the inflammation observed during spaceflight [63–66]. More recently, Zhu and colleagues [67] showed that the retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptor (RLR) and Toll-like receptor (TLR) signaling pathways, essential for antiviral immunity, are significantly compromised in zebrafish embryos subjected to simulated microgravity. This discovery contributes to the understanding of the

disruption of antiviral immune function in microgravity, which is manifested by an increased incidence of viral infections [68]. Indeed, the cardinal elements of the immune system are shared by all gnathostomes, including zebrafish and amphibians [69–71].

The proteomic analysis of *X. laevis* embryos exposed to simulated microgravity using an RPM during the first 6 days of development revealed that the expression of important factors involved in the organization and stabilization of the cytoskeleton, such as Arp (actin-related protein) 3 and stathmin, are heavily affected by microgravity [72]. In line with this observation, several other studies have reported that in various cell types, the cytoskeleton disorganizes in real microgravity or in response to altered gravity [73–78], thus showing that this structure, which gives shape and mechanical strength to cells, plays a role in sensing gravity changes, as suggested by Ingber [79]. Indeed, cells may sense mechanical stresses through changes in the balance of forces that are transmitted across transmembrane adhesion receptors that link the cytoskeleton to the extracellular matrix and to other cells [80,81].

The exposure of zebrafish larvae to 3 g from days 5 to 9 post-fertilization resulted in a significant increase in bone formation in a subset of cranial bones [12]. In contrast, 5 days of simulated microgravity caused a significant decrease in bone formation in zebrafish larvae [13]. In mice, quantitative PCR analyses have highlighted that the expression of two osteogenic differentiation genes (alkaline phosphatase (ALP) and type I collagen (Col-1)) is increased in the tibia when they are subjected to a hypergravity of 2 g for 2 weeks [82]. This deregulation was not observed after longer exposures at 2 or 3 g [83,84], suggesting a transient impact of hypergravity on bone metabolism factors and/or different impacts depending on the intensity of the applied gravitational force. Interestingly, the deregulation of these two factors was reverted by a vestibular lesion [78,80]. Vestibular lesion may moderate the effects of hypergravity, as it has been shown that hypergravity affects bone and muscle through vestibular signaling and subsequent autonomic nervous system in mice [83,85]. The hindlimb unloading model (HU), used to mimic microgravity, revealed activation of NF- κ B, which plays a major role in bone mass reduction [10]. NF- κ B1 has been shown to disrupt the proportion and/or potential of osteoprogenitors or immature osteoblasts [10]. NF- κ B has also been shown to activate the expression of RANKL, which induces bone resorption [86]. Another important factor for bone homeostasis is Piezo-1. Studies have shown that Piezo-1 is a skeletal mechanosensor that regulates bone homeostasis and that its expression is reduced in osteoblasts of HU mice, which leads to bone loss and resorption [87,88]. HU also produced evidence of a decrease in ERK1/2 activity and an increase in p38 activation, leading to a decrease in the activation of RUNX2 and an increase in PPAR γ 2 activation, respectively. RUNX2 is an important factor for the differentiation of osteoblasts from mesenchymal precursors, and PPAR γ 2 is a factor involved in the differentiation of mesenchymal precursors into adipocytes. Thus, these changes lead to a decrease in osteoblast production in favor of adipocytes [89].

Recent studies performed using mice as animal models have shown that the adaptation of muscles depends on their function. Indeed, proteomic study of the soleus and extensor digitorum longus muscles—respectively slow and fast skeletal muscles—revealed different protein abundance profiles after 28 days spent at 3 g and suggested that the soleus is more sensitive to hypergravity than the extensor digitorum longus muscle [85]. In accordance with these observations, another report showed that the expression of MyoD, Myf6, and myogenin mRNAs (involved in myogenesis regulation) is increased in the soleus of mice that spent 4 weeks at 3 g and that, as observed in muscle, these deregulations are corrected by a vestibular lesion [83]. Later, the same team discovered that through the vestibular system, hypergravity enhances the expression of FKBP5 and OFLM1 genes in muscle [90,91]. The muscle response also depends on the applied gravitational force, as protein synthesis and phosphorylation of anabolic markers (AKT, p70s6k, 4E-BP1, GSK-3beta, and eEF2) were not modified in the soleus of mice exposed for 30 days at 2 g, whereas these parameters were altered in the tibialis anterior [92]. The duration of altered gravity exposure is another

important parameter, as it was shown that MyoD mRNA expression was not affected after 2 weeks spent at 2 g, whereas it was decreased after 8 weeks spent at 2 g [84].

Finally, different studies have been conducted to elucidate the potential implication of humoral factors in muscle and bone communication when gravity is changed. In this context, it was noted that hypergravity elevates serum and mRNA levels of follistatin, an endogenous inhibitor of myostatin, in the soleus of mice. This increase was positively correlated with trabecular bone mineral content. Furthermore, the amount of follistatin mRNA was decreased in myoblastic C2C12 cells under simulated microgravity, suggesting the implication of follistatin in adaptation to gravity [82]. More recently, DNA microarray studies identified Dickkopf (Dkk) 2, a Wnt/ β -catenin signaling inhibitor, as a potential humoral factor involved in muscle and bone communication. Indeed, HU significantly elevated serum Dkk2 levels and Dkk2 mRNA levels in the soleus of mice, whereas hypergravity significantly decreased those Dkk2 levels. In contrast to follistatin, the Dkk2 serum level was negatively correlated with trabecular bone mineral density [93].

Note that modifications of bone microstructure can impact the immune system. Indeed, although multipotent hematopoietic progenitors were not affected by HU [31], a decrease in red blood cells was observed in the bone marrow [94]. An HU-induced decrease in B lymphopoiesis was observed as of the common lymphoid progenitor stage, with a major block at the pro-B to pre-B cell transition. This observation was associated with a decrease in bone microstructure, a reduced expression of B-cell transcription factors (early B-cell factor (EBF) and Pax5), and an alteration in STAT5-mediated IL-7 signaling [31]. This blockage likely explains the lower percentage of B-cells observed in the periphery [94,95]. HU also decreased the ratio between helper and cytotoxic T-cells in the spleen [95] and increased the percentages of monocytes and macrophages in the bone marrow [94]. These last deregulations may be due to changes in the expression levels of hematopoietic-related genes such as leptin, GM-CSF, Flt-3, IL-3, and PPAR γ 2 [90].

6. How Can GEPAM Contribute to the Identification of Countermeasures?

Artificial gravity has been proposed as a countermeasure to mitigate physiological deconditioning caused by prolonged exposure to weightlessness [96–98] and therefore to protect human health during long-duration deep space missions. As mentioned in the introduction, immune dysregulation and bone loss are major adverse consequences of spaceflight. Indeed, spaceflight leads to a decrease in murine bone microstructure, hematopoiesis, and B-lymphopoiesis, as observed in old mice, suggesting that adaptation to space has immunosenescence characteristics [32,63]. Preservation of bone structure through chronic mild exposure to hypergravity could contribute to maintaining immune cell homeostasis. This hypothesis is supported by various studies showing that 2 g exposure has positive effects on several murine bone parameters [84,99] and that hypergravity increases bone formation in zebrafish [12]. Furthermore, the occurrence of allergy-related dysfunctional states associated with health problems in crews in space and analogous environments [25,100] could possibly be modulated by hypergravity [101]. Indeed, a recent study showed that hypergravity enhances the effect of dexamethasone in a murine model of allergic asthma and rhinitis, as indicated by the reduction of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid and eosinophilic infiltration into the lungs and nasal cavity [102]. Thus, combining drug administration with hypergravity exposure could potentially be a strategy to improve drug efficacy. It has also been shown that hypergravity has positive effects on trabecular bone and muscle typology in osteoarthritic mice [103]. These effects were similar to those induced by resistance exercises, but negative effects were noted for cortical bone. The latter observation shows that further studies are warranted to precisely determine how to use artificial gravity as a countermeasure. The intensity and duration of hypergravity exposure will need to be finely tuned to avoid side effects. Indeed, deleterious effects on the skeleton have been observed in mice after 3 weeks spent at 3 g [99]. A rupture of organism adaptation has also been observed at 3 g that leads to an increase in stress [104], which may have a negative impact on bones and the immune system [105,106]. Significant changes in intestinal microbiota, which is essential for survival,

health, and well-being, as it ensures important functions and modulates the immune system, were also reported [107–109]. Furthermore, it has been shown that hypergravity exposure during murine development strongly modifies the repertoire of T-cell receptors (TCRs) of newborn mice [110] and that prolonged centrifugation (>1 day at 2 g) can affect the permeability of the blood–brain barrier [111].

Hindlimb unloading has been useful in identifying promising pharmacological countermeasures to mitigate the negative effects of spaceflight (reviewed in [112]). This ground-based model revealed that nucleotide supplementation has immunoprotective effects and lowers plasma corticosterone, which is a strong immune modulator. Hindlimb unloading also highlighted the immunoenhancer properties of the active hexose-correlated compound (AHCC). AHCC is an extract prepared from cocultured mycelia of several species of Basidiomycete fungi. AHCC increases the expression of the linker for activated T-cells (LAT) gene. LAT is the primary activator after TCR engagement. As an adaptor protein, the main function of LAT in TCR signaling is its tyrosine phosphorylation and subsequent recruitment of other signaling proteins. Upon TCR engagement, the phosphorylation of LAT allows it to interact with several SH2 domain-containing proteins, such as Grb2, Gads, and PLC- γ 1. Thus, AHCC, through its action on LAT, can restore T-cell activation in immunosuppressive scenarios. AHCC also reduces inflammatory markers and stress hormones in hindlimb-unloaded rodents.

7. Conclusions and Perspectives

The Gravitational Experimental Platform for Animal Models, GEPAM, allows the exposure of aquatic animal models (currently amphibian embryos/tadpoles) and mice to altered gravity. This platform will contribute to examining the molecular and cellular mechanisms responsible for the manifold changes occurring in animals when exposed to altered gravity. Lower vertebrates, such as small fish species and tadpoles, are excellent models for developmental and biomedical research and meet many technical requirements associated with spaceflight experiments. Analyses of mechanisms and signaling pathways preserved during the evolution of jawed vertebrates are of particular interest, as they will provide very useful information for the preparation of future manned space exploration missions. This platform can also help validate certain hypotheses and experiments before their verification or implementation in real spaceflight conditions. The exposure of animals to altered gravity is also a means of seeking reliable and effective countermeasures. Testing nutrients and pharmacological products will provide new preventive and therapeutic tools to counterbalance dysfunctions encountered in space and on Earth, such as those induced by aging, as a multitude of similarities between the physiological deconditioning induced by spaceflight and that related to aging have been noted [113,114], or acute and chronic stress exposure [115]. In the future, developments allowing the exposure of small fish (e.g., zebrafish) or fish embryos to different levels of hypergravity or simulated microgravity are foreseen, as well as the installation of small cell culture incubators in gondolas of the rodent rotor.

8. Accessibility

GEPAM is accessible through ESA's continuously open research announcements website [116]. Before applying, it is recommended to contact either J. Bonnefoy (julie.bonnefoy@univ-lorraine.fr), S. Ghislin (stephanie.ghislin@univ-lorraine.fr) or J.-P. Frippiat (jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr) to obtain more information, such as technical details.

Author Contributions: J.-P.F. conceived the platform and wrote the manuscript. J.B. (Julie Bonnefoy), S.G., J.B. (Jérôme Beyrend) and G.C. maintain the platform and supervised animal treatments. J.B. (Julie Bonnefoy) performed experiments with the help of J.B. (Jérôme Beyrend) and J.-P.F. and analyzed data with the help of S.G. and F.C. Assistance with platform design and manuscript corrections were provided by I.L., S.P. and G.G.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the French Space Agency (CNES) (grant DAR 4800000641), the French Ministry of Higher Education and Research, the Université de Lorraine, the CPER IT2MP (State-Region Project Contract, Technological Innovations, Modeling and Personalized Medicine) and FEDER (European Regional Development Fund). The APC was funded by the French Ministry of Higher Education and Research.

Institutional Review Board Statement: 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). Animal house agreement number C54-547-30 delivered on 21 March 2019 by the Prefecture of Meurthe and Moselle, France. Experimental ethics agreement number 20068-2019032911322507 delivered on 29 September 2020 by the French Ministry of Higher Education and Research.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this published article.

Acknowledgments: We thank Yannick Ledore from the UR AFPA USC INRA 340 unit for his advices regarding the construction of the new amphibian hosting area.

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

Abbreviations

3Rs	Replacement, Reduction and Refinement, a rule for performing more humane animal research
ACBS	Animalerie du Campus Biologie Santé (animal facility of the biology and health campus).
AHCC	active hexose-correlated compound
ESA	European Space Agency
g	gravity on Earth
GEPAM	gravitational experimental platform for animal models
HU	hindlimb unloading
ISS	international space station
RPM	random positioning machine
rVOR	roll-induced vestibulo-ocular reflex
StAR-LUE	Structure d'Appui à la Recherche—Lorraine Université d'Excellence (Research Support Structure—Lorraine University of Excellence)
TCR	T-cell receptor
TLR	Toll-like receptor

References

1. Hariom, S.K.; Ravi, A.; Mohan, G.R.; Pochiraju, H.; Chattopadhyay, S.; Nelson, E. Animal Physiology across the Gravity Continuum. *Acta Astronaut.* **2021**, *178*, 522–535. [[CrossRef](#)]
2. English, K.L.; Bloomberg, J.J.; Mulavara, A.P.; Ploutz-Snyder, L.L. Exercise Countermeasures to Neuromuscular Deconditioning in Spaceflight. *Compr. Physiol.* **2019**, *10*, 171–196. [[CrossRef](#)]
3. Coupé, M.; Fortrat, J.O.; Larina, I.; Gauquelin-Koch, G.; Gharib, C.; Custaud, M.A. Cardiovascular Deconditioning: From Autonomic Nervous System to Microvascular Dysfunctions. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2009**, *169*, S10–S12. [[CrossRef](#)]
4. Fritsch-Yelle, J.M.; Charles, J.B.; Jones, M.M.; Wood, M.L. Microgravity Decreases Heart Rate and Arterial Pressure in Humans. *J. Appl. Physiol.* **1996**, *80*, 910–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Liu, Z.; Wan, Y.; Zhang, L.; Tian, Y.; Lv, K.; Li, Y.; Wang, C.; Chen, X.; Chen, S.; Guo, J. Alterations in the Heart Rate and Activity Rhythms of Three Orbital Astronauts on a Space Mission. *Life Sci. Space Res.* **2015**, *4*, 62–66. [[CrossRef](#)]
6. Gerbaix, M.; Gnyubkin, V.; Farlay, D.; Olivier, C.; Ammann, P.; Courbon, G.; Laroche, N.; Genthial, R.; Follet, H.; Peyrin, F.; et al. One-Month Spaceflight Compromises the Bone Microstructure, Tissue-Level Mechanical Properties, Osteocyte Survival and Lacunae Volume in Mature Mice Skeletons. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. 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. *Front Physiol.* **2018**, *9*, 746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Vico, L.; Hargens, A. Skeletal Changes during and after Spaceflight. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2018**, *14*, 229–245. [[CrossRef](#)]
9. Grimm, D.; Grosse, J.; Wehland, M.; Mann, V.; Reseland, J.E.; Sundaresan, A.; Corydon, T.J. The Impact of Microgravity on Bone in Humans. *Bone* **2016**, *87*, 44–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Nakamura, H.; Aoki, K.; Masuda, W.; Alles, N.; Nagano, K.; Fukushima, H.; Osawa, K.; Yasuda, H.; Nakamura, I.; Mikuni-Takagaki, Y.; et al. Disruption of NF- κ B1 Prevents Bone Loss Caused by Mechanical Unloading. *J. Bone Miner. Res.* **2013**, *28*, 1457–1467. [[CrossRef](#)]
11. Bloomfield, S.A.; Martinez, D.A.; Boudreaux, R.D.; Mantri, A.V. Microgravity Stress: Bone and Connective Tissue. *Compr. Physiol.* **2016**, *6*, 645–686. [[CrossRef](#)]
12. Aceto, J.; Nourizadeh-Lillabadi, R.; Marée, R.; Dardenne, N.; Jeanray, N.; Wehenkel, L.; Aleström, P.; van Loon, J.J.W.A.; Muller, M. Zebrafish Bone and General Physiology Are Differently Affected by Hormones or Changes in Gravity. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126928. [[CrossRef](#)]
13. Aceto, J.; Nourizadeh-Lillabadi, R.; Bradamante, S.; Maier, J.A.; Alestrom, P.; van Loon, J.J.; Muller, M. Effects of Microgravity Simulation on Zebrafish Transcriptomes and Bone Physiology-Exposure Starting at 5 Days Post Fertilization. *NPJ Microgravity* **2016**, *2*, 16010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Morita, H.; Abe, C.; Tanaka, K. Long-Term Exposure to Microgravity Impairs Vestibulo-Cardiovascular Reflex. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33405. [[CrossRef](#)]
15. Hallgren, E.; Kornilova, L.; Fransen, E.; Glukhikh, D.; Moore, S.T.; Clément, G.; Van Ombergen, A.; MacDougall, H.; Naumov, I.; Wuyts, F.L. Decreased Otolith-Mediated Vestibular Response in 25 Astronauts Induced by Long-Duration Spaceflight. *J. Neurophysiol.* **2016**, *115*, 3045–3051. [[CrossRef](#)]
16. Brungs, S.; Hauslage, J.; Hilbig, R.; Hemmersbach, R.; Anken, R. Effects of Simulated Weightlessness on Fish Otolith Growth: Clinostat versus Rotating-Wall Vessel. *Adv. Space Res.* **2011**, *48*, 792–798. [[CrossRef](#)]
17. Horn, E.R. Microgravity-Induced Modifications of the Vestibuloocular Reflex in *Xenopus Laevis* Tadpoles Are Related to Development and the Occurrence of Tail Lordosis. *J. Exp. Biol.* **2006**, *209*, 2847–2858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Gabriel, M.; Frippiat, J.-P.; Frey, H.; Horn, E.R. The Sensitivity of an Immature Vestibular System to Altered Gravity. *J. Exp. Zool A Ecol. Genet. Physiol.* **2012**, *317*, 333–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Crucian, B.; Stowe, R.P.; Mehta, S.; Quiriarte, H.; Pierson, D.; Sams, C. Alterations in Adaptive Immunity Persist during Long-Duration Spaceflight. *NPJ Microgravity* **2015**, *1*, 15013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. 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](#)] [[PubMed](#)]
21. 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](#)]
22. Crucian, B.; Johnston, S.; Mehta, S.; Stowe, R.; Uchakin, P.; Quiriarte, 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](#)] [[PubMed](#)]
23. 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](#)]
24. 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](#)]
25. 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](#)]
26. Akiyama, T.; Horie, K.; Hinoi, E.; Hiraiwa, M.; Kato, A.; Maekawa, Y.; Takahashi, A.; Furukawa, S. How Does Spaceflight Affect the Acquired Immune System? *NPJ Microgravity* **2020**, *6*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Boxio, R.; Dournon, C.; Frippiat, J.-P. Effects of a Long-Term Spaceflight on Immunoglobulin Heavy Chains of the Urodele Amphibian *Pleurodeles xaltl*. *J. Appl. Physiol.* **2005**, *98*, 905–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. 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.* **2009**, *23*, 1607–1615. [[CrossRef](#)]
29. 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.* **2011**, *25*, 2947–2955. [[CrossRef](#)]
30. Huin-Schohn, C.; Guéguinou, N.; Schenten, V.; Bascove, M.; Koch, G.G.; Baatout, S.; Tschirhart, E.; Frippiat, J.-P. Gravity Changes during Animal Development Affect IgM Heavy-Chain Transcription and Probably Lymphopoiesis. *FASEB J.* **2013**, *27*, 333–341. [[CrossRef](#)]
31. Lescale, C.; Schenten, V.; Djegloul, 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.* **2015**, *29*, 455–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. 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.* **2019**, *33*, 3772–3783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Buchheim, J.-I.; Ghislin, S.; Ouzren, N.; Albuissou, E.; Vanet, A.; Matzel, S.; Ponomarev, S.; Rykova, M.; Choukér, A.; Fripiat, J.-P. Plasticity of the Human IgM Repertoire in Response to Long-Term Spaceflight. *FASEB J.* **2020**, *34*, 16144–16162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sachs, L.M.; Buchholz, D.R. Frogs Model Man: In Vivo Thyroid Hormone Signaling during Development. *Genesis* **2017**, *55*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Schaaf, M.J.M. Nuclear Receptor Research in Zebrafish. *J. Mol. Endocrinol.* **2017**, *59*, R65–R76. [[CrossRef](#)]
36. Wang, S.; Miller, S.R.; Ober, E.A.; Sadler, K.C. Making It New Again: Insight into Liver Development, Regeneration, and Disease From Zebrafish Research. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2017**, *124*, 161–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hardwick, L.J.A.; Philpott, A. Xenopus Models of Cancer: Expanding the Oncologist's Toolbox. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1660. [[CrossRef](#)]
38. Matsuoka, R.L.; Stainier, D.Y.R. Recent Insights into Vascular Development from Studies in Zebrafish. *Curr. Opin. Hematol.* **2018**, *25*, 204–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Olson, H.M.; Nechiporuk, A.V. Using Zebrafish to Study Collective Cell Migration in Development and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 83. [[CrossRef](#)]
40. Blackburn, A.T.M.; Miller, R.K. Modeling Congenital Kidney Diseases in *Xenopus laevis*. *Dis. Model. Mech.* **2019**, *12*. [[CrossRef](#)]
41. Hoppler, S.; Conlon, F.L. *Xenopus*: Experimental Access to Cardiovascular Development, Regeneration Discovery, and Cardiovascular Heart-Defect Modeling. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **2020**, *12*, a037200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Phipps, L.S.; Marshall, L.; Dorey, K.; Amaya, E. Model Systems for Regeneration: *Xenopus*. *Development* **2020**, *147*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Tonelli, F.; Bek, J.W.; Besio, R.; De Clercq, A.; Leoni, L.; Salmon, P.; Coucke, P.J.; Willaert, A.; Forlino, A. Zebrafish: A Resourceful Vertebrate Model to Investigate Skeletal Disorders. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Fripiat, 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](#)]
45. Horn, E.; Böser, S.; Franz, M.; Gabriel, M.; Hiesgen, N.; Kuebler, U.; Porciani, M.; Schwarzwälder, A.; Zolesi, V. Development of the Flight Hardware for the Experiment XENOPUS on the Kubik BIO4-Mission. *Microgravity Sci. Technol.* **2011**, *23*, 243–248. [[CrossRef](#)]
46. Globus, R.K.; Morey-Holton, E. Hindlimb Unloading: Rodent Analog for Microgravity. *J. Appl. Physiol.* **2016**, *120*, 1196–1206. [[CrossRef](#)]
47. Chapes, S.K.; Mastro, A.M.; Sonnenfeld, G.; Berry, W.D. Antiorthostatic Suspension as a Model for the Effects of Spaceflight on the Immune System. *J. Leukoc Biol.* **1993**, *54*, 227–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mouse Genome Informatics. Available online: <http://www.informatics.jax.org/> (accessed on 13 March 2021).
49. Knight, J. The Zebrafish Information Network. Available online: <https://zfin.org/> (accessed on 13 March 2021).
50. Karimi, K.; Fortriede, J.D.; Lotay, V.S.; Burns, K.A.; Wang, D.Z.; Fisher, M.E.; Pells, T.J.; James-Zorn, C.; Wang, Y.; Ponferrada, V.G.; et al. Xenbase: A Genomic, Epigenomic and Transcriptomic Model Organism Database. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D861–D868. [[CrossRef](#)]
51. Motorine, I. UMS2008/US40 IBSLor. Available online: <https://umsibslor.univ-lorraine.fr/en> (accessed on 13 March 2021).
52. Wang, L.D.; Wagers, A.J. Dynamic Niches in the Origination and Differentiation of Haematopoietic Stem Cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 643–655. [[CrossRef](#)]
53. Dinan, T.G.; Cryan, J.F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **2017**, *46*, 77–89. [[CrossRef](#)]
54. Boudarra, N.; Fripiat, C.; Dournon, C.; Fripiat, J.-P. An Alternative Internal Splicing Site Defines New Ikaros Isoforms in *Pleurodeles waltl*. *Dev. Comp. Immunol.* **2002**, *26*, 659–673. [[CrossRef](#)]
55. Paulsen, K.; Thiel, C.; Timm, J.; Schmidt, P.M.; Huber, K.; Tauber, S.; Hemmersbach, R.; Seibt, D.; Kroll, H.; Grote, K.-H.; et al. Microgravity-Induced Alterations in Signal Transduction in Cells of the Immune System. *Acta Astronaut.* **2010**, *67*, 1116–1125. [[CrossRef](#)]
56. Zwart, S.R.; Pierson, D.; Mehta, S.; Gonda, S.; Smith, S.M. Capacity of Omega-3 Fatty Acids or Eicosapentaenoic Acid to Counteract Weightlessness-Induced Bone Loss by Inhibiting NF-KappaB Activation: From Cells to Bed Rest to Astronauts. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *25*, 1049–1057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Chang, T.T.; Walther, I.; Li, C.-F.; Boonyaratanakornkit, J.; Galleri, G.; Meloni, M.A.; Pippia, P.; Cogoli, A.; Hughes-Fulford, M. The Rel/NF-KB Pathway and Transcription of Immediate Early Genes in T Cell Activation Are Inhibited by Microgravity. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *92*, 1133–1145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Gridley, D.S.; Mao, X.W.; Stodieck, L.S.; Ferguson, V.L.; Bateman, T.A.; Moldovan, M.; Cunningham, C.E.; Jones, T.A.; Slater, J.M.; Pecaut, M.J. Correction: Changes in Mouse Thymus and Spleen after Return from the STS-135 Mission in Space. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)]
59. Zhao, T.; Li, R.; Tan, X.; Zhang, J.; Fan, C.; Zhao, Q.; Deng, Y.; Xu, A.; Lukong, K.E.; Genth, H.; et al. Simulated Microgravity Reduces Focal Adhesions and Alters Cytoskeleton and Nuclear Positioning Leading to Enhanced Apoptosis via Suppressing FAK/RhoA-Mediated MTORC1/NF-KB and ERK1/2 Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1994. [[CrossRef](#)]
60. Zhang, Y.; Moreno-Villanueva, M.; Krieger, S.; Ramesh, G.T.; Neelam, S.; Wu, H. Transcriptomics, NF-KB Pathway, and Their Potential Spaceflight-Related Health Consequences. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1166. [[CrossRef](#)]

61. Vallabhapurapu, S.; Karin, M. Regulation and Function of NF-KappaB Transcription Factors in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 693–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Guéguinou, N.; Jeandel, J.; Kaminski, S.; Baatout, S.; Ghislin, S.; Frippiat, J.-P. Modulation of Iberian Ribbed Newt Complement Component C3 by Stressors Similar to Those Encountered during a Stay Onboard the International Space Station. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1579. [[CrossRef](#)]
63. Buchheim, J.-I.; Matzel, S.; Rykova, M.; Vassilieva, G.; Ponomarev, S.; Nichiporuk, I.; Hörl, M.; Moser, D.; Biere, K.; Feuerecker, M.; et al. Stress Related Shift Toward Inflammation in Cosmonauts After Long-Duration Space Flight. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Garrett-Bakelman, F.E.; Darshi, M.; Green, S.J.; Gur, R.C.; Lin, L.; Macias, B.R.; McKenna, M.J.; Meydan, C.; Mishra, T.; Nasrini, J.; et al. The NASA Twins Study: A Multidimensional Analysis of a Year-Long Human Spaceflight. *Science* **2019**, *364*. [[CrossRef](#)]
65. Afshinnekoo, E.; Scott, R.T.; MacKay, M.J.; Pariset, E.; Cekanaviciute, E.; Barker, R.; Gilroy, S.; Hassane, D.; Smith, S.M.; Zwart, S.R.; et al. Fundamental Biological Features of Spaceflight: Advancing the Field to Enable Deep-Space Exploration. *Cell* **2020**, *183*, 1162–1184. [[CrossRef](#)]
66. da Silveira, W.A.; Fazelinia, H.; Rosenthal, S.B.; Laiakis, E.C.; Kim, M.S.; Meydan, C.; Kidane, Y.; Rathi, K.S.; Smith, S.M.; Stear, B.; et al. Comprehensive Multi-Omics Analysis Reveals Mitochondrial Stress as a Central Biological Hub for Spaceflight Impact. *Cell* **2020**, *183*, 1185–1201.e20. [[CrossRef](#)]
67. Zhu, L.; Nie, L.; Xie, S.; Li, M.; Zhu, C.; Qiu, X.; Kuang, J.; Liu, C.; Lu, C.; Li, W.; et al. Attenuation of Antiviral Immune Response Caused by Perturbation of TRIM25-Mediated RIG-I Activation under Simulated Microgravity. *Cell Rep.* **2021**, *34*, 108600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Bigley, A.B.; Agha, N.H.; Baker, F.L.; Spielmann, G.; Kunz, H.E.; Mylabathula, P.L.; Rooney, B.V.; Laughlin, M.S.; Mehta, S.K.; Pierson, D.L.; et al. NK Cell Function Is Impaired during Long-Duration Spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **2019**, *126*, 842–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Cooper, M.D.; Alder, M.N. The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell* **2006**, *124*, 815–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. 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](#)] [[PubMed](#)]
71. 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](#)]
72. Tedeschi, G.; Pagliato, L.; Negroni, M.; Montorfano, G.; Corsetto, P.; Nonnis, S.; Negri, A.; Rizzo, A.M. Protein Pattern of *Xenopus Laevis* Embryos Grown in Simulated Microgravity. *Cell Biol. Int.* **2011**, *35*, 249–258. [[CrossRef](#)]
73. Nassef, M.Z.; Kopp, S.; Wehland, M.; Melnik, D.; Sahana, J.; Krüger, M.; Corydon, T.J.; Oltmann, H.; Schmitz, B.; Schütte, A.; et al. Real Microgravity Influences the Cytoskeleton and Focal Adhesions in Human Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3156. [[CrossRef](#)]
74. Thiel, C.S.; Tauber, S.; Lauber, B.; Polzer, J.; Seebacher, C.; Uhl, R.; Neelam, S.; Zhang, Y.; Levine, H.; Ullrich, O. Rapid Morphological and Cytoskeletal Response to Microgravity in Human Primary Macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Corydon, T.J.; Kopp, S.; Wehland, M.; Braun, M.; Schütte, A.; Mayer, T.; Hülsing, T.; Oltmann, H.; Schmitz, B.; Hemmersbach, R.; et al. Alterations of the Cytoskeleton in Human Cells in Space Proved by Life-Cell Imaging. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Versari, S.; Villa, A.; Bradamante, S.; Maier, J.A.M. Alterations of the Actin Cytoskeleton and Increased Nitric Oxide Synthesis Are Common Features in Human Primary Endothelial Cell Response to Changes in Gravity. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 1645–1652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Kumei, Y.; Morita, S.; Katano, H.; Akiyama, H.; Hirano, M.; Oyha, K.; Shimokawa, H. Microgravity Signal Ensnares Cell Adhesion, Cytoskeleton, and Matrix Proteins of Rat Osteoblasts: Osteopontin, CD44, Osteonectin, and Alpha-Tubulin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1090*, 311–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Lewis, M.L. The Cytoskeleton, Apoptosis, and Gene Expression in T Lymphocytes and Other Mammalian Cells Exposed to Altered Gravity. *Adv. Space Biol. Med.* **2002**, *8*, 77–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Ingber, D. How Cells (Might) Sense Microgravity. *FASEB J.* **1999**, *13*, S3–S15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Wang, N.; Butler, J.P.; Ingber, D.E. Mechanotransduction across the Cell Surface and through the Cytoskeleton. *Science* **1993**, *260*, 1124–1127. [[CrossRef](#)]
81. Maniatis, A.J.; Chen, C.S.; Ingber, D.E. Demonstration of Mechanical Connections between Integrins, Cytoskeletal Filaments, and Nucleoplasm That Stabilize Nuclear Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 849–854. [[CrossRef](#)]
82. Kawao, N.; Morita, H.; Obata, K.; Tatsumi, K.; Kaji, H. Role of Follistatin in Muscle and Bone Alterations Induced by Gravity Change in Mice. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 1191–1201. [[CrossRef](#)]
83. Kawao, N.; Morita, H.; Obata, K.; Tamura, Y.; Okumoto, K.; Kaji, H. The Vestibular System Is Critical for the Changes in Muscle and Bone Induced by Hypergravity in Mice. *Physiol. Rep.* **2016**, *4*. [[CrossRef](#)]
84. Kawao, N.; Morita, H.; Nishida, K.; Obata, K.; Tatsumi, K.; Kaji, H. Effects of Hypergravity on Gene Levels in Anti-Gravity Muscle and Bone through the Vestibular System in Mice. *J. Physiol. Sci.* **2018**, *68*, 609–616. [[CrossRef](#)]

85. Ohira, T.; Ino, Y.; Nakai, Y.; Morita, H.; Kimura, A.; Kurata, Y.; Kagawa, H.; Kimura, M.; Egashira, K.; Moriya, S.; et al. Proteomic Analysis Revealed Different Responses to Hypergravity of Soleus and Extensor Digitorum Longus Muscles in Mice. *J. Proteom.* **2020**, *217*, 103686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Miyazaki, T.; Zhao, Z.; Ichihara, Y.; Yoshino, D.; Imamura, T.; Sawada, K.; Hayano, S.; Kamioka, H.; Mori, S.; Hirata, H.; et al. Mechanical Regulation of Bone Homeostasis through P130Cas-Mediated Alleviation of NF- κ B Activity. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaau7802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Sun, W.; Chi, S.; Li, Y.; Ling, S.; Tan, Y.; Xu, Y.; Jiang, F.; Li, J.; Liu, C.; Zhong, G.; et al. The Mechanosensitive Piezo1 Channel Is Required for Bone Formation. *eLife* **2019**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Wang, L.; You, X.; Lotinun, S.; Zhang, L.; Wu, N.; Zou, W. Mechanical Sensing Protein PIEZO1 Regulates Bone Homeostasis via Osteoblast-Osteoclast Crosstalk. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Zayzafoon, M.; Gathings, W.E.; McDonald, J.M. Modeled Microgravity Inhibits Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Increases Adipogenesis. *Endocrinology* **2004**, *145*, 2421–2432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Shimoide, T.; Kawao, N.; Tamura, Y.; Morita, H.; Kaji, H. Novel Roles of FKBP5 in Muscle Alteration Induced by Gravity Change in Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *479*, 602–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Shimoide, T.; Kawao, N.; Morita, H.; Ishida, M.; Takafuji, Y.; Kaji, H. Roles of Olfactomedin 1 in Muscle and Bone Alterations Induced by Gravity Change in Mice. *Calcif. Tissue Int.* **2020**, *107*, 180–190. [[CrossRef](#)]
92. Mirzoev, T.; Tyganov, S.; Petrova, I.; Gnyubkin, V.; Laroche, N.; Vico, L.; Shenkman, B. Divergent Anabolic Signalling Responses of Murine Soleus and Tibialis Anterior Muscles to Chronic 2G Hypergravity. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3514. [[CrossRef](#)]
93. Kawao, N.; Morita, H.; Iemura, S.; Ishida, M.; Kaji, H. Roles of Dkk2 in the Linkage from Muscle to Bone during Mechanical Unloading in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2547. [[CrossRef](#)]
94. Dai, S.; Kong, F.; Liu, C.; Xiao, F.; Dong, X.; Zhang, Y.; Wang, H. Effect of Simulated Microgravity Conditions of Hindlimb Unloading on Mice Hematopoietic and Mesenchymal Stromal Cells. *Cell Biol. Int.* **2020**, *44*, 2243–2252. [[CrossRef](#)]
95. Gagnier, 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](#)] [[PubMed](#)]
96. Frett, T.; Petrat, G.; van Loon, J.J.; Hemmersbach, R.; Anken, R. Hypergravity Facilities in the ESA Ground-Based Facility Program—Current Research Activities and Future Tasks. *Microgravity Sci. Technol.* **2016**, *28*, 205–214. [[CrossRef](#)]
97. Konishi, T.; Kurazumi, T.; Kato, T.; Takko, C.; Ogawa, Y.; Iwasaki, K.-I. Time-Dependent Changes in Cerebral Blood Flow and Arterial Pressure during Mild+ Gz Hypergravity. *Aerosp. Med. Hum. Perform.* **2018**, *89*, 787–791. [[CrossRef](#)]
98. De Cesari, C.; Barravecchia, I.; Pyankova, O.V.; Vezza, M.; Germani, M.M.; Scebbba, F.; van Loon, J.J.; Angeloni, D. Hypergravity Activates a Pro-Angiogenic Homeostatic Response by Human Capillary Endothelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Gnyubkin, V.; Guignandon, A.; Laroche, N.; Vanden-Bossche, A.; Normand, M.; Lafage-Proust, M.-H.; Vico, L. Effects of Chronic Hypergravity: From Adaptive to Deleterious Responses in Growing Mouse Skeleton. *J. Appl. Physiol.* **2015**, *119*, 908–917. [[CrossRef](#)]
100. Feurecker, M.; Crucian, B.E.; Quintens, R.; Buchheim, J.-I.; Salam, A.P.; Rybka, A.; Moreels, M.; Stewe, C.; Stowe, R.; Mehta, S.; et al. Immune Sensitization during 1 Year in the Antarctic High-Altitude Concordia Environment. *Allergy* **2019**, *74*, 64–77. [[CrossRef](#)]
101. Jang, T.Y.; Jung, A.-Y.; Kim, Y.H. Hormetic Effect of Chronic Hypergravity in a Mouse Model of Allergic Asthma and Rhinitis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27260. [[CrossRef](#)]
102. Jang, T.Y.; Jung, A.-Y.; Kwon, S.; Kim, Y.H. Hypergravity Enhances the Therapeutic Effect of Dexamethasone in Allergic Asthma and Rhinitis Animal Model. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0197594. [[CrossRef](#)]
103. Dechaumet, B.; Cleret, D.; Linossier, M.-T.; Vanden-Bossche, A.; Chanon, S.; Lefai, E.; Laroche, N.; Lafage-Proust, M.-H.; Vico, L. Hypergravity as a Gravitational Therapy Mitigates the Effects of Knee Osteoarthritis on the Musculoskeletal System in a Murine Model. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0243098. [[CrossRef](#)]
104. 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](#)] [[PubMed](#)]
105. Taves, M.D.; Hamden, J.E.; Soma, K.K. Local Glucocorticoid Production in Lymphoid Organs of Mice and Birds: Functions in Lymphocyte Development. *Horm. Behav.* **2017**, *88*, 4–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Wippert, P.-M.; Rector, M.; Kuhn, G.; Wuertz-Kozak, K. Stress and Alterations in Bones: An Interdisciplinary Perspective. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 96. [[CrossRef](#)]
107. Shi, J.; Wang, Y.; He, J.; Li, P.; Jin, R.; Wang, K.; Xu, X.; Hao, J.; Zhang, Y.; Liu, H.; et al. Intestinal Microbiota Contributes to Colonic Epithelial Changes in Simulated Microgravity Mouse Model. *FASEB J.* **2017**, *31*, 3695–3709. [[CrossRef](#)]
108. Alauzet, C.; Cunat, L.; Wack, M.; Lozniewski, A.; Busby, H.; Agrinier, N.; Cailliez-Grimal, C.; Frippiat, J.-P. Hypergravity Disrupts Murine Intestinal Microbiota. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Alauzet, C.; Cunat, L.; Wack, M.; Lanfumey, L.; Legrand-Frossi, C.; Lozniewski, A.; Agrinier, N.; Cailliez-Grimal, C.; Frippiat, J.-P. Impact of a Model Used to Simulate Chronic Socio-Environmental Stressors Encountered during Spaceflight on Murine Intestinal Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

110. Ghislin, S.; Ouzren-Zarhloul, N.; Kaminski, S.; Frippiat, J.-P. Hypergravity Exposure during Gestation Modifies the TCR β Repertoire of Newborn Mice. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Dubayle, D.; Vanden-Bossche, A.; Beraneck, M.; Vico, L.; Morel, J.-L. Effects of Centrifugation and Whole-Body Vibrations on Blood-Brain Barrier Permeability in Mice. *NPJ Microgravity* **2020**, *6*, 1. [[CrossRef](#)]
112. Le, T.T.; Ropars, A.; Sundaresan, A.; Crucian, B.; Choukèr, A.; Frippiat, J.-P. Pharmacological countermeasures to spaceflight-induced alterations of the immune system. In *Stress Challenges and Immunity in Space*; Choukèr, A., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2020; pp. 637–657.
113. Vernikos, J.; Schneider, V.S. Space, Gravity and the Physiology of Aging: Parallel or Convergent Disciplines? A Mini-Review. *Gerontology* **2010**, *56*, 157–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Stollo, F.; Gentile, S.; Stollo, G.; Mambro, A.; Vernikos, J. Recent Progress in Space Physiology and Aging. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1551. [[CrossRef](#)]
115. Godbout, J.P.; Glaser, R. Stress-Induced Immune Dysregulation: Implications for Wound Healing, Infectious Disease and Cancer. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2006**, *1*, 421–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. The European Space Agency. Available online: http://www.esa.int/Science_Exploration/Human_and_Robotic_Exploration/Research/Research_Announcements#GBF (accessed on 13 March 2021).

Annexe 3

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 e.g. 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]. Consequently, they do not exclusively results from acute stress encountered during landing or re-adaptation to normal gravity.

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.

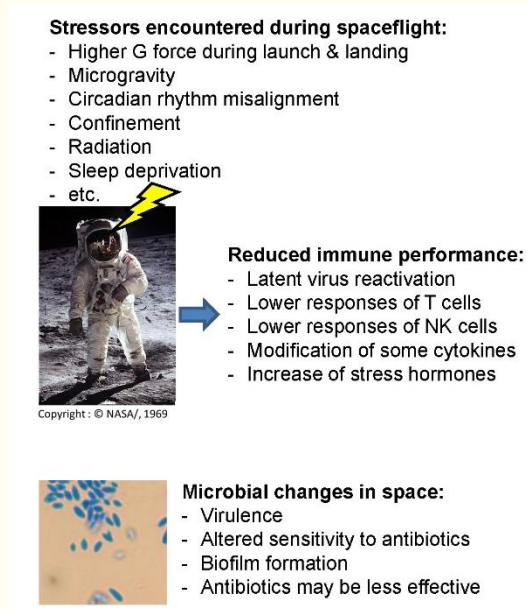


Figure 1.

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⁺ 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].

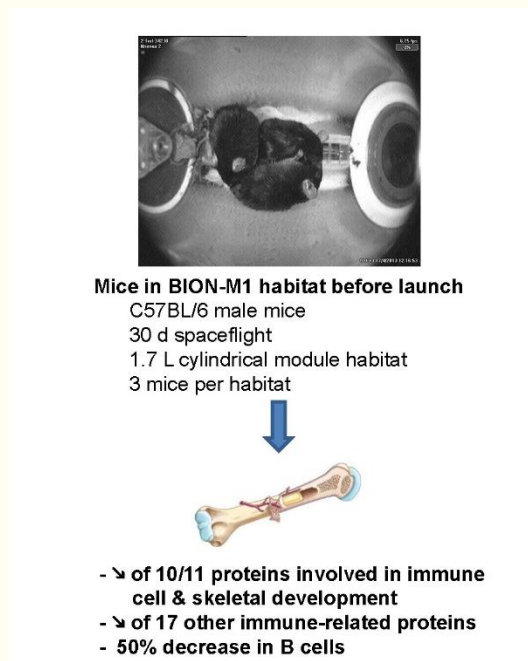


Figure 2.

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 ($CD4^+CD8^+$) and single positive ($CD4^+$ or $CD8^+$) 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.

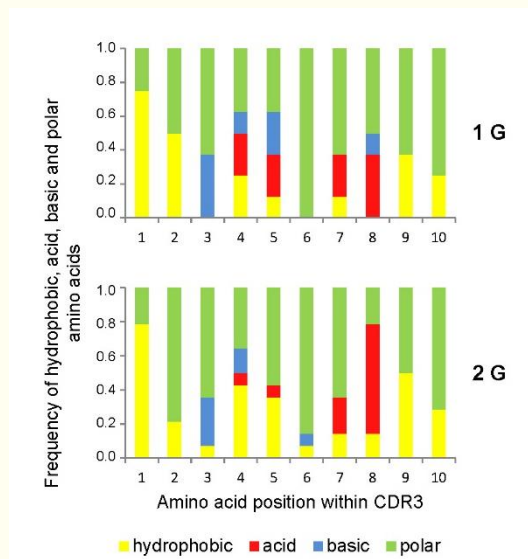


Figure 3.

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].

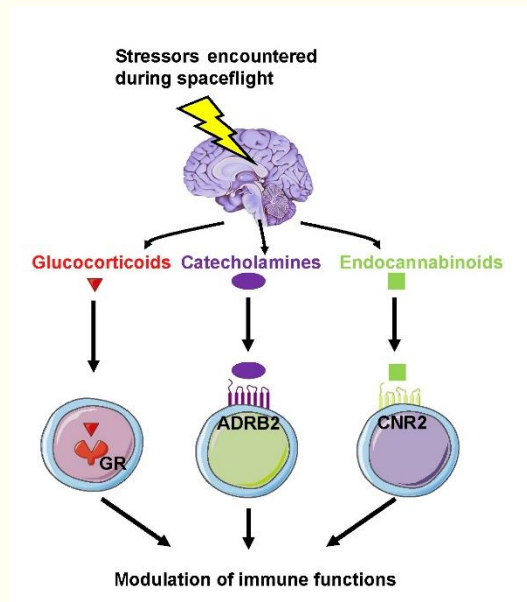


Figure 4.

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⁺ 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 opposite, numerous studies have shown a significant reduction in T cell activity under real or 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 an 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 spaceflights 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 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].

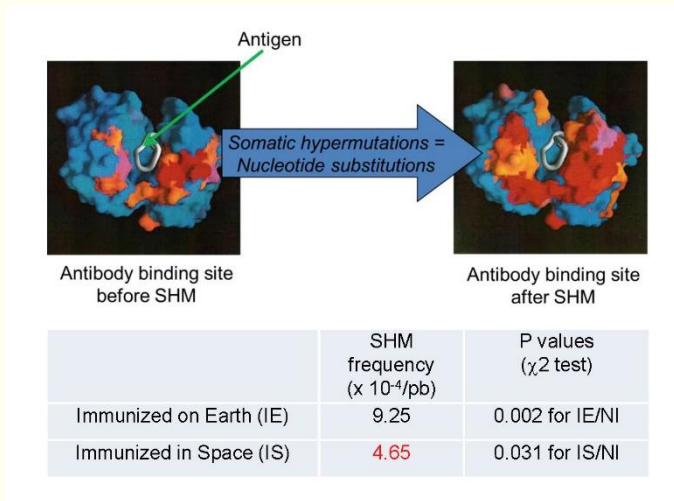


Figure 5.

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 time 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 these knowledge are 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 using miniature and autonomous biosensors to help establishing personalized treatments. This corresponds to a new field of research, space biotechnology, whose aim is to use advanced techniques ("omics" techniques) for the quantitative detections 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 contribute to 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 β 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- β 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, Quiariarte 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, 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 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-III. *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-κB 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, Fripiat 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, Fripiat 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, Schaeferlinger B, Gauquelin-Koch G, Fripiat 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, 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: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/JCI157834](https://doi.org/10.1172/JCI157834)
- [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 Inflammation 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

[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.

[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.



Références bibliographiques

- Abarrategui, I., Krangel, M.S., 2009. Germline transcription: a key regulator of accessibility and recombination. *Adv Exp Med Biol* 650, 93–102. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0296-2_8
- Abraham, C., Cho, J.H., 2009. IL-23 and autoimmunity: new insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 60, 97–110. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.051407.123757>
- Aceto, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Marée, R., Dardenne, N., Jeanray, N., Wehenkel, L., Aleström, P., Loon, J.J.W.A. van, Muller, M., 2015. Zebrafish Bone and General Physiology Are Differently Affected by Hormones or Changes in Gravity. *PLOS ONE* 10, e0126928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126928>
- Akkaya, M., Kwak, K., Pierce, S.K., 2020. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol* 20, 229–238. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0244-2>
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>
- Allman, D., Pillai, S., 2008. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.014>
- Altenburg, S.D., Nielsen-Preiss, S.M., Hyman, L.E., 2008. Increased filamentous growth of *Candida albicans* in simulated microgravity. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 6, 42–50. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60019-4](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60019-4)
- Álvarez-Errico, D., Vento-Tormo, R., Sieweke, M., Ballestar, E., 2015. Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. *Nat Rev Immunol* 15, 7–17. <https://doi.org/10.1038/nri3777>
- Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., Becker, J.C., 2006. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 126, 32–41. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001>
- Annunziato, F., Romagnani, C., Romagnani, S., 2015. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.001>
- Aoyama, T., Okamoto, T., Nagayama, S., Nishijo, K., Ishibe, T., Yasura, K., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J., 2004. Methylation in the core-promoter region of the chondromodulin-I gene determines the cell-specific expression by regulating the binding of transcriptional activator Sp3. *J Biol Chem* 279, 28789–28797. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401273200>
- Arango Duque, G., Descoteaux, A., 2014. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>

- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21, 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Baqai, F.P., Gridley, D.S., Slater, J.M., Luo-Owen, X., Stodieck, L.S., Ferguson, V., Chapes, S.K., Pecauc, M.J., 2009. Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *J. Appl. Physiol.* 106, 1935–1942. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91361.2008>
- Barthlott, T., Handel, A.E., Teh, H.Y., Wirasinha, R.C., Hafen, K., Žuklys, S., Roch, B., Orkin, S.H., de Villartay, J.-P., Daley, S.R., Holländer, G.A., 2021. Indispensable epigenetic control of thymic epithelial cell development and function by polycomb repressive complex 2. *Nat Commun* 12, 3933. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24158-w>
- Bassing, C.H., Alt, F.W., Hughes, M.M., D’Auteuil, M., Wehrly, T.D., Woodman, B.B., Gärtner, F., White, J.M., Davidson, L., Sleckman, B.P., 2000. Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. *Nature* 405, 583–586. <https://doi.org/10.1038/35014635>
- Bassing, C.H., Swat, W., Alt, F.W., 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl, S45-55. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00675-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00675-x)
- Bauer, M.E., 2005. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress* 8, 69–83. <https://doi.org/10.1080/10253890500100240>
- Bauer, M.E., Jeckel, C.M.M., Luz, C., 2009. The role of stress factors during aging of the immune system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1153, 139–152. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03966.x>
- Benjamin, C.L., Stowe, R.P., John, L.S., Sams, C.F., Mehta, S.K., Crucian, B.E., Pierson, D.L., Komanduri, K.V., 2016. Decreases in thymopoiesis of astronauts returning from space flight. *JCI Insight* 1. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88787>
- Bernard, C., 1865. Introduction à l’étude de la médecine expérimentale, Garnier-Flammarion.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>
- Bird, A.P., 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209–213. <https://doi.org/10.1038/321209a0>
- Blanchard, C., Rothenberg, M.E., 2009. Chapter 3 Biology of the Eosinophil, in: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 81–121. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)01003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)01003-1)
- Bloomfield, S.A., Martinez, D.A., Boudreaux, R.D., Mantri, A.V., 2016. Microgravity Stress: Bone and Connective Tissue. *Compr Physiol* 6, 645–686.

<https://doi.org/10.1002/cphy.c130027>

- Bonneau, R.H., Sheridan, J.F., Feng, N.G., Glaser, R., 1991. Stress-induced suppression of herpes simplex virus (HSV)-specific cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell activity and enhancement of acute pathogenesis following local HSV infection. *Brain Behav Immun* 5, 170–192. [https://doi.org/10.1016/0889-1591\(91\)90015-3](https://doi.org/10.1016/0889-1591(91)90015-3)
- Bonnefoy, F., Couturier, M., Clauzon, A., Rémy-Martin, J.-P., Gaugler, B., Tiberghien, P., Chen, W., Saas, P., Perruche, S., 2011. TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment. *J. Immunol.* 186, 6157–6164. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002497>
- Bonnefoy, J., Baselet, B., Moser, D., Ghislin, S., Miranda, S., Riant, E., Vermeesen, R., Keiler, A.M., Baatout, S., Choukér, A., Fripiat, J.-P., 2022. B-Cell Homeostasis Is Maintained During Two Months of Head-Down Tilt Bed Rest With or Without Antioxidant Supplementation. *Front Immunol* 13, 830662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.830662>
- Bonnefoy, J., Ghislin, S., Beyrend, J., Coste, F., Calcagno, G., Lartaud, I., Gauquelin-Koch, G., Poussier, S., Fripiat, J.-P., 2021. Gravitational Experimental Platform for Animal Models, a New Platform at ESA's Terrestrial Facilities to Study the Effects of Micro- and Hypergravity on Aquatic and Rodent Animal Models. *IJMS* 22, 2961. <https://doi.org/10.3390/ijms22062961>
- Boonyaratanakornkit, J.B., Cogoli, A., Li, C.-F., Schopper, T., Pippia, P., Galleri, G., Meloni, M.A., Hughes-Fulford, M., 2005. Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J.* 19, 2020–2022. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3778fje>
- Bosch, J.A., Berntson, G.G., Cacioppo, J.T., Dhabhar, F.S., Marucha, P.T., 2003. Acute stress evokes selective mobilization of T cells that differ in chemokine receptor expression: a potential pathway linking immunologic reactivity to cardiovascular disease. *Brain Behav Immun* 17, 251–259. [https://doi.org/10.1016/s0889-1591\(03\)00054-0](https://doi.org/10.1016/s0889-1591(03)00054-0)
- Boukhaled, G.M., Cordeiro, B., Deblois, G., Dimitrov, V., Bailey, S.D., Holowka, T., Domi, A., Guak, H., Chiu, H.-H.C., Everts, B., Pearce, E.J., Lupien, M., White, J.H., Krawczyk, C.M., 2016. The Transcriptional Repressor Polycomb Group Factor 6, PCGF6, Negatively Regulates Dendritic Cell Activation and Promotes Quiescence. *Cell Reports* 16, 1829–1837. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.026>
- Brady, B.L., Steinel, N.C., Bassing, C.H., 2010. Antigen receptor allelic exclusion: an update and reappraisal. *J Immunol* 185, 3801–3808. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001158>
- Brandsma, I., Gent, D.C., 2012. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr* 3, 9. <https://doi.org/10.1186/2041-9414-3-9>
- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J.L., Maliszewski, C.R., 2000. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96, 3029–3039. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.9.3029>
- Brawand, P., Fitzpatrick, D.R., Greenfield, B.W., Brasel, K., Maliszewski, C.R., De Smedt, T.,

2002. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J. Immunol.* 169, 6711–6719.
- Bröske, A.-M., Vockentanz, L., Kharazi, S., Huska, M.R., Mancini, E., Scheller, M., Kuhl, C., Enns, A., Prinz, M., Jaenisch, R., Nerlov, C., Leutz, A., Andrade-Navarro, M.A., Jacobsen, S.E.W., Rosenbauer, F., 2009. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet* 41, 1207–1215. <https://doi.org/10.1038/ng.463>
- Brosschot, J.F., Benschop, R.J., Godaert, G.L., Olf, M., De Smet, M., Heijnen, C.J., Ballieux, R.E., 1994. Influence of life stress on immunological reactivity to mild psychological stress. *Psychosom Med* 56, 216–224. <https://doi.org/10.1097/00006842-199405000-00007>
- Brungs, S., Egli, M., Wuest, S.L., M. Christianen, P.C., W. A. van Loon, J.J., Ngo Anh, T.J., Hemmersbach, R., 2016. Facilities for Simulation of Microgravity in the ESA Ground-Based Facility Programme. *Microgravity Sci. Technol.* 28, 191–203. <https://doi.org/10.1007/s12217-015-9471-8>
- Burchfield, J.S., Li, Q., Wang, H.Y., Wang, R.-F., 2015. JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 67, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.006>
- Call, M.E., Wucherpfennig, K.W., 2005. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol* 23, 101–125. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115625>
- Campos, E.I., Reinberg, D., 2009. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 43, 559–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.032608.103928>
- Cannon, W.B., 1934. The Wisdom of the Body. *Nature* 133, 82–82. <https://doi.org/10.1038/133082a0>
- Chang, T.T., Walther, I., Li, C.-F., Boonyaratanakornkit, J., Galleri, G., Meloni, M.A., Pippia, P., Cogoli, A., Hughes-Fulford, M., 2012. The Rel/NF-κB pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1133–1145. <https://doi.org/10.1189/jlb.0312157>
- Chapes, S.K., Mastro, A.M., Sonnenfeld, G., Berry, W.D., 1993. Antiorthostatic suspension as a model for the effects of spaceflight on the immune system. *J Leukoc Biol* 54, 227–235. <https://doi.org/10.1002/jlb.54.3.227>
- Chapes, S.K., Simske, S.J., Sonnenfeld, G., Miller, E.S., Zimmerman, R.J., 1999. Effects of spaceflight and PEG-IL-2 on rat physiological and immunological responses. *Journal of Applied Physiology* 86, 2065–2076. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.86.6.2065>
- Chapman, K., Holmes, M., Seckl, J., 2013. 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiol Rev* 93, 1139–1206. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012>
- Chen, Y., Zander, R., Khatun, A., Schauder, D.M., Cui, W., 2018. Transcriptional and Epigenetic

Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation. *Frontiers in Immunology* 9.

- Choi, J., Lee, S.J., Lee, Y.A., Maeng, H.G., Lee, J.K., Kang, Y.W., 2014. Reference values for peripheral blood lymphocyte subsets in a healthy Korean population. *Immune Netw* 14, 289–295. <https://doi.org/10.4110/in.2014.14.6.289>
- Chothia, C., Boswell, D.R., Lesk, A.M., 1988. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *EMBO J* 7, 3745–3755.
- Chu, B., Marwaha, K., Sanvictores, T., Ayers, D., 2022. Physiology, Stress Reaction, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Cieslak, A., Charbonnier, G., Tesio, M., Mathieu, E.-L., Belhocine, M., Touzart, A., Smith, C., Hypolite, G., Andrieu, G.P., Martens, J.H.A., Janssen-Megens, E., Gut, M., Gut, I., Boissel, N., Petit, A., Puthier, D., Macintyre, E., Stunnenberg, H.G., Spicuglia, S., Asnafi, V., 2020. Blueprint of human thymopoiesis reveals molecular mechanisms of stage-specific TCR enhancer activation. *J Exp Med* 217, e20192360. <https://doi.org/10.1084/jem.20192360>
- Cogoli, A., 1981. Hematological and immunological changes during space flight. *Acta Astronaut* 8, 995–1002. [https://doi.org/10.1016/0094-5765\(81\)90070-9](https://doi.org/10.1016/0094-5765(81)90070-9)
- Cogoli, A., Bechler, B., Cogoli-Greuter, M., Criswell, S.B., Joller, H., Joller, P., Hunzinger, E., Müller, O., 1993. Mitogenic signal transduction in T lymphocytes in microgravity. *J Leukoc Biol* 53, 569–575. <https://doi.org/10.1002/jlb.53.5.569>
- Cogoli, A., Cogoli-Greuter, M., 1997. Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity. *Adv Space Biol Med* 6, 33–79. [https://doi.org/10.1016/s1569-2574\(08\)60077-5](https://doi.org/10.1016/s1569-2574(08)60077-5)
- Cong, M., Liu, T., Tian, D., Guo, H., Wang, P., Liu, K., Lin, J., Tian, Y., Shi, W., You, H., Jia, J., Zhang, D., 2016. Interleukin-2 Enhances the Regulatory Functions of CD4(+)T Cell-Derived CD4(-)CD8(-) Double Negative T Cells. *J Interferon Cytokine Res* 36, 499–505. <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0093>
- Congdon, C.C., Allebban, Z., Gibson, L.A., Kaplansky, A., Strickland, K.M., Jago, T.L., Johnson, D.L., Lange, R.D., Ichiki, A.T., 1996. Lymphatic tissue changes in rats flown on Spacelab Life Sciences-2. *Journal of Applied Physiology* 81, 172–177. <https://doi.org/10.1152/jappl.1996.81.1.172>
- Cooper, H.S., 1996. The loneliness of the long-duration astronaut. *Air Space* 11, 37–45.
- Corcoran, L., Ferrero, I., Vremec, D., Lucas, K., Waithman, J., O’Keeffe, M., Wu, L., Wilson, A., Shortman, K., 2003. The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J. Immunol.* 170, 4926–4932.
- Correa, L.O., Jordan, M.S., Carty, S.A., 2020. DNA Methylation in T-Cell Development and Differentiation. *Crit Rev Immunol* 40, 135–156. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2020033728>
- Corthay, A., 2009. How do regulatory T cells work? *Scand. J. Immunol.* 70, 326–336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x>

- Crucian, B., Babiak-Vazquez, A., Johnston, S., Pierson, D.L., Ott, C.M., Sams, C., 2016. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *Int J Gen Med* 9, 383–391. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S114188>
- Crucian, B., Simpson, R.J., Mehta, S., Stowe, R., Chouker, A., Hwang, S.-A., Actor, J.K., Salam, A.P., Pierson, D., Sams, C., 2014. Terrestrial stress analogs for spaceflight associated immune system dysregulation. *Brain, Behavior, and Immunity* 39, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.01.011>
- Crucian, B., Stowe, R., Mehta, S., Uchakin, P., Quiariarte, H., Pierson, D., Sams, C., 2013. Immune system dysregulation occurs during short duration spaceflight on board the space shuttle. *J Clin Immunol* 33, 456–465. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9824-7>
- Crucian, B.E., Choukèr, A., Simpson, R.J., Mehta, S., Marshall, G., Smith, S.M., Zwart, S.R., Heer, M., Ponomarev, S., Whitmire, A., Frippiat, J.P., Douglas, G.L., Lorenzi, H., Buchheim, J.-I., Makedonas, G., Ginsburg, G.S., Ott, C.M., Pierson, D.L., Krieger, S.S., Baecker, N., Sams, C., 2018. Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions. *Front. Immunol.* 9, 1437. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01437>
- Crucian, B.E., Stowe, R.P., Mehta, S.K., Yetman, D.L., Leal, M.J., Quiariarte, H.D., Pierson, D.L., Sams, C.F., 2009. Immune status, latent viral reactivation, and stress during long-duration head-down bed rest. *Aviat Space Environ Med* 80, A37-44. <https://doi.org/10.3357/asem.br05.2009>
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744–748. <https://doi.org/10.1038/nature01355>
- Darwin, C., 1859. *On the Origin of Species*.
- Davis, M.M., Bjorkman, P.J., 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395–402. <https://doi.org/10.1038/334395a0>
- Davis, R.S., 2015. B-1 Cell Development and Function. *Ann N Y Acad Sci* 1362, 110–116. <https://doi.org/10.1111/nyas.12771>
- Davis, T.A., Wiesmann, W., Kidwell, W., Cannon, T., Kerns, L., Serke, C., Delaplaine, T., Pranger, A., Lee, K.P., 1996. Effect of spaceflight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myelopoiesis. *J Leukoc Biol* 60, 69–76. <https://doi.org/10.1002/jlb.60.1.69>
- de Kloet, E.R., Joëls, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463–475. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>
- De Santa, F., Narang, V., Yap, Z.H., Tusi, B.K., Burgold, T., Austenaa, L., Bucci, G., Caganova, M., Notarbartolo, S., Casola, S., Testa, G., Sung, W.-K., Wei, C.-L., Natoli, G., 2009. Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages. *EMBO J* 28, 3341–3352. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.271>
- del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Kremmer, E., Förster, R., 2007. CD103- and CD103+

- bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 178, 6861–6866. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6861>
- Deshayes, F., Fradet, M., Kaminski, S., Viguier, M., Fripiat, J.-P., Ghislin, S., 2022. Link between the EZH2 noncanonical pathway and microtubule organization center polarization during early T lymphopoiesis. *Sci Rep* 12, 3655. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07684-5>
- Dhabhar, F.S., 2014. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol. Res.* 58, 193–210. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8517-0>
- Dhabhar, F.S., McEWEN, B.S., 2007. Bi-directional Effects of Stress on Immune Function: Possible Explanations for Salubrious as Well as Harmful Effects, in: Ader, R. (Ed.), *Psychoneuroimmunology* (Fourth Edition). Academic Press, Burlington, pp. 723–760. <https://doi.org/10.1016/B978-012088576-3/50041-1>
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 1059–1064. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.1059>
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 1997. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 11, 286–306. <https://doi.org/10.1006/brbi.1997.0508>
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J. Immunol.* 157, 1638–1644.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1995. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J. Immunol.* 154, 5511–5527.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., Stein, M., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1994. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. *Brain Behav Immun* 8, 66–79. <https://doi.org/10.1006/brbi.1994.1006>
- Dhabhar, F.S., Viswanathan, K., 2005. Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289, R738–R744. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00145.2005>
- Dijk, D.J., Neri, D.F., Wyatt, J.K., Ronda, J.M., Riel, E., Ritz-De Cecco, A., Hughes, R.J., Elliott, A.R., Prisk, G.K., West, J.B., Czeisler, C.A., 2001. Sleep, performance, circadian rhythms, and light-dark cycles during two space shuttle flights. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R1647-1664. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.5.R1647>
- Dijkstra, C.E., Larkin, O.J., Anthony, P., Davey, M.R., Eaves, L., Rees, C.E.D., Hill, R.J.A., 2011. Diamagnetic levitation enhances growth of liquid bacterial cultures by increasing oxygen availability. *J R Soc Interface* 8, 334–344. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0294>

- Dik, W.A., Pike-Overzet, K., Weerkamp, F., de Ridder, D., de Haas, E.F.E., Baert, M.R.M., van der Spek, P., Koster, E.E.L., Reinders, M.J.T., van Dongen, J.J.M., Langerak, A.W., Staal, F.J.T., 2005. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med* 201, 1715–1723. <https://doi.org/10.1084/jem.20042524>
- Doñas, C., Carrasco, M., Fritz, M., Prado, C., Tejón, G., Osorio-Barrios, F., Manríquez, V., Reyes, P., Pacheco, R., Bono, M.R., Loyola, A., Roseblatt, M., 2016. The histone demethylase inhibitor GSK-J4 limits inflammation through the induction of a tolerogenic phenotype on DCs. *J Autoimmun* 75, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.07.011>
- Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.-W., Park, C.G., Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C., 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107–111. <https://doi.org/10.1126/science.1136080>
- Dueva, R., Akopyan, K., Pederiva, C., Trevisan, D., Dhanjal, S., Lindqvist, A., Farnebo, M., 2019. Neutralization of the Positive Charges on Histone Tails by RNA Promotes an Open Chromatin Structure. *Cell Chem Biol* 26, 1436-1449.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.08.002>
- Dunn, A.J., 2006. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res* 6, 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.cnr.2006.04.002>
- Dunn, C.D., Johnson, P.C., Lange, R.D., Perez, L., Nessel, R., 1985. Regulation of hematopoiesis in rats exposed to antiorthostatic, hypokinetic/hypodynamia: I. Model description. *Aviat Space Environ Med* 56, 419–426.
- Duprat, A.M., Husson, D., Gualandris-Parisot, L., 1998. Does gravity influence the early stages of the development of the nervous system in an amphibian? *Brain Res Brain Res Rev* 28, 19–24. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00022-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00022-8)
- Eaves, C.J., 2015. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 125, 2605–2613. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-570200>
- Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., 2006. Stress system--organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation* 13, 257–267. <https://doi.org/10.1159/000104853>
- Elliott, D.E., Siddique, S.S., Weinstock, J.V., 2014. Innate Immunity in Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 12, 749–755. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.03.007>
- Esteller, M., 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286–298. <https://doi.org/10.1038/nrg2005>
- Fedorova, E., Zink, D., 2008. Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta* 1783, 2174–2184. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.018>
- Föger, N., Marhaba, R., Zöller, M., 2000. CD44 supports T cell proliferation and apoptosis by apposition of protein kinases. *Eur J Immunol* 30, 2888–2899. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200010\)30:10<2888::AID-](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200010)30:10<2888::AID-)

- Fonte, C., Kaminski, S., Vanet, A., Lanfumey, L., Cohen-Salmon, C., Ghislin, S., Fripiat, J.-P., 2019. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR- β repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB J* 33, 896–908. <https://doi.org/10.1096/fj.201800969R>
- Friedl-Werner, A., Machado, M.-L., Balestra, C., Liegard, Y., Philoxene, B., Brauns, K., Stahn, A.C., Hitier, M., Besnard, S., 2021. Impaired Attentional Processing During Parabolic Flight. *Frontiers in Physiology* 12.
- Fripiat, J.-P., Crucian, B.E., de Quervain, D.J.-F., Grimm, D., Montano, N., Praun, S., Roozendaal, B., Schelling, G., Thiel, M., Ullrich, O., Choukèr, A., 2016. Towards human exploration of space: The THESEUS review series on immunology research priorities. *npj Microgravity* 2. <https://doi.org/10.1038/npjmgrav.2016.40>
- Furukawa, T., Tanimoto, K., Fukazawa, T., Imura, T., Kawahara, Y., Yuge, L., 2018. Simulated microgravity attenuates myogenic differentiation via epigenetic regulations. *npj Microgravity* 4, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41526-018-0045-0>
- Gambacurta, A., Merlini, G., Ruggiero, C., Diedenhofen, G., Battista, N., Bari, M., Balsamo, M., Piccirillo, S., Valentini, G., Mascetti, G., Maccarrone, M., 2019. Human osteogenic differentiation in Space: proteomic and epigenetic clues to better understand osteoporosis. *Sci Rep* 9, 8343. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44593-6>
- Garrett-Bakelman, F.E., Darshi, M., Green, S.J., Gur, R.C., Lin, L., Macias, B.R., McKenna, M.J., Meydan, C., Mishra, T., Nasrini, J., Piening, B.D., Rizzardi, L.F., Sharma, K., Siamwala, J.H., Taylor, L., Vitaterna, M.H., Afkarian, M., Afshinnekoo, E., Ahadi, S., Ambati, A., Arya, M., Bezdán, D., Callahan, C.M., Chen, S., Choi, A.M.K., Chlipala, G.E., Contrepois, K., Covington, M., Crucian, B.E., De Vivo, I., Dinges, D.F., Ebert, D.J., Feinberg, J.I., Gandara, J.A., George, K.A., Goutsias, J., Grills, G.S., Hargens, A.R., Heer, M., Hillary, R.P., Hoofnagle, A.N., Hook, V.Y.H., Jenkinson, G., Jiang, P., Keshavarzian, A., Laurie, S.S., Lee-McMullen, B., Lumpkins, S.B., MacKay, M., Maienschein-Cline, M.G., Melnick, A.M., Moore, T.M., Nakahira, K., Patel, H.H., Pietrzyk, R., Rao, V., Saito, R., Salins, D.N., Schilling, J.M., Sears, D.D., Sheridan, C.K., Stenger, M.B., Tryggvadottir, R., Urban, A.E., Vaisar, T., Van Espen, B., Zhang, J., Ziegler, M.G., Zwart, S.R., Charles, J.B., Kundrot, C.E., Scott, G.B.I., Bailey, S.M., Basner, M., Feinberg, A.P., Lee, S.M.C., Mason, C.E., Mignot, E., Rana, B.K., Smith, S.M., Snyder, M.P., Turek, F.W., 2019. The NASA Twins Study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight. *Science* 364, eaau8650. <https://doi.org/10.1126/science.aau8650>
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K., 2010. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 327, 656–661. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>
- Germain, R.N., Stefanová, I., 1999. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol* 17, 467–522. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.467>
- Ghislin, S., Ouzren-Zarhloul, N., Kaminski, S., Fripiat, J.-P., 2015. Hypergravity exposure

- during gestation modifies the TCR β repertoire of newborn mice. *Scientific Reports* 5. <https://doi.org/10.1038/srep09318>
- Giangregorio, L., Blimkie, C.J.R., 2002. Skeletal adaptations to alterations in weight-bearing activity: a comparison of models of disuse osteoporosis. *Sports Med* 32, 459–476. <https://doi.org/10.2165/00007256-200232070-00005>
- Giudicelli, V., Chaume, D., Lefranc, M.-P., 2005. IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res* 33, D256–D261. <https://doi.org/10.1093/nar/gki010>
- Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J.K., 2005. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* 5, 243–251. <https://doi.org/10.1038/nri1571>
- Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J.K., Stout, J.C., Tarr, K.L., Speicher, C.E., Holliday, J.E., 1985. Stress-related impairments in cellular immunity. *Psychiatry Res* 16, 233–239. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(85\)90111-8](https://doi.org/10.1016/0165-1781(85)90111-8)
- Glaser, R., MacCallum, R.C., Laskowski, B.F., Malarkey, W.B., Sheridan, J.F., Kiecolt-Glaser, J.K., 2001. Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56, M477-482. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.8.m477>
- Glaser, R., Rice, J., Speicher, C.E., Stout, J.C., Kiecolt-Glaser, J.K., 1986. Stress depresses interferon production by leukocytes concomitant with a decrease in natural killer cell activity. *Behav Neurosci* 100, 675–678. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.100.5.675>
- Globus, R.K., Morey-Holton, E., 2016. Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. *Journal of Applied Physiology* 120, 1196–1206. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00997.2015>
- Godbout, J.P., Glaser, R., 2006. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J Neuroimmune Pharmacol* 1, 421–427. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9036-0>
- Godoy, L.D., Rossignoli, M.T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N., de Lima Umeoka, E.H., 2018. A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12.
- Gopalakrishnan, S., Majumder, K., Predeus, A., Huang, Y., Koues, O.I., Verma-Gaur, J., Loguercio, S., Su, A.I., Feeney, A.J., Artyomov, M.N., Oltz, E.M., 2013. Unifying model for molecular determinants of the preselection V β repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304048110>
- Grbesa, I., Hakim, O., 2017. Genomic effects of glucocorticoids. *Protoplasma* 254, 1175–1185. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1063-y>
- Guéguinou, N., Bojados, M., Jamon, M., Derradji, H., Baatout, S., Tschirhart, E., Fripiat, J.-P., Legrand-Frossi, C., 2012. Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice. *Psychoneuroendocrinology* 37, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.05.015>

- Guéguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J.-L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C., Fripiat, J.-P., 2009. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J. Leukoc. Biol.* 86, 1027–1038. <https://doi.org/10.1189/jlb.0309167>
- Gulati, A., Kaur, D., Krishna Prasad, G.V.R., Mukhopadhaya, A., 2018. PRR Function of Innate Immune Receptors in Recognition of Bacteria or Bacterial Ligands, in: Chattopadhyay, K., Basu, S.C. (Eds.), *Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore, Singapore, pp. 255–280. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3065-0_18
- Gunawan, M., Venkatesan, N., Loh, J.T., Wong, J.F., Berger, H., Neo, W.H., Li, L.Y.J., La Win, M.K., Yau, Y.H., Guo, T., See, P.C.E., Yamazaki, S., Chin, K.C., Gingras, A.R., Shochat, S.G., Ng, L.G., Sze, S.K., Ginhoux, F., Su, I. -hsin, 2015. The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin. *Nat. Immunol.* 16, 505–516. <https://doi.org/10.1038/ni.3125>
- Guo, C., Gerasimova, T., Hao, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Selimyan, R., Oltz, E.M., Sen, R., 2011. Two Forms of Loops Generate the Chromatin Conformation of the Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Locus. *Cell* 147, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.049>
- Guo, X., Zhou, Y., Wu, T., Zhu, X., Lai, W., Wu, L., 2016. Generation of mouse and human dendritic cells in vitro. *J Immunol Methods* 432, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.02.011>
- Haniffa, M., Collin, M., Ginhoux, F., 2013. Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv. Immunol.* 120, 1–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417028-5.00001-6>
- Hannum, C., Freed, Johnh., Tarr, G., Kappler, J., Marrack, P., 1984. Biochemistry and Distribution of the T Cell Receptor. *Immunological Reviews* 81, 161–176. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1984.tb01109.x>
- Hariom, S.K., Ravi, A., Mohan, G.R., Pochiraju, H.D., Chattopadhyay, S., Nelson, E.J.R., 2021. Animal physiology across the gravity continuum. *Acta Astronautica* 178, 522–535. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2020.09.044>
- Hawkins, P.G., Santoso, S., Adams, C., Anest, V., Morris, K.V., 2009. Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res* 37, 2984–2995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp127>
- Hemmi, H., Akira, S., 2005. TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy* 86, 120–135. <https://doi.org/10.1159/000086657>
- 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., Medina, F.J., Vagt, N., Ullrich, O., van Loon, J.J.W.A., Hemmersbach, R., 2013. Ground-Based Facilities for Simulation of Microgravity: Organism-Specific Recommendations for Their Use, and Recommended Terminology. *Astrobiology* 13, 1–17. <https://doi.org/10.1089/ast.2012.0876>

- Herranz, R., Larkin, O.J., Dijkstra, C.E., Hill, R.J., Anthony, P., Davey, M.R., Eaves, L., van Loon, J.J., Medina, F.J., Marco, R., 2012. Microgravity simulation by diamagnetic levitation: effects of a strong gradient magnetic field on the transcriptional profile of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* 13, 52. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-52>
- Hirayama, D., Iida, T., Nakase, H., 2017. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *IJMS* 19, 92. <https://doi.org/10.3390/ijms19010092>
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., Choy, S.H.Y., Grisotto, M., Renia, L., Conway, S.J., Stanley, E.R., Chan, J.K.Y., Ng, L.G., Samokhvalov, I.M., Merad, M., Ginhoux, F., 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 209, 1167–1181. <https://doi.org/10.1084/jem.20120340>
- Horie, K., Kato, T., Kudo, T., Sasanuma, H., Miyauchi, M., Akiyama, N., Miyao, T., Seki, T., Ishikawa, T., Takakura, Y., Shirakawa, M., Shiba, D., Hamada, M., Jeon, H., Yoshida, N., Inoue, J.-I., Muratani, M., Takahashi, S., Ohno, H., Akiyama, T., 2019. Impact of spaceflight on the murine thymus and mitigation by exposure to artificial gravity during spaceflight. *Sci Rep* 9, 19866. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56432-9>
- Hu, G., Cui, K., Fang, D., Hirose, S., Wang, X., Wangsa, D., Jin, W., Ried, T., Liu, P., Zhu, J., Rothenberg, E.V., Zhao, K., 2018. Transformation of Accessible Chromatin and 3D Nucleome Underlies Lineage Commitment of Early T Cells. *Immunity* 48, 227-242.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.013>
- Hughes-Fulford, M., 2003. Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. *Adv Space Res* 32, 1585–1593. [https://doi.org/10.1016/S0273-1177\(03\)90399-1](https://doi.org/10.1016/S0273-1177(03)90399-1)
- Huin-Schohn, C., Gueguinou, N., Schenten, V., Bascove, M., Koch, G.G., Baatout, S., Tschirhart, E., Fripiat, J.-P., 2013. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB Journal* 27, 333–341. <https://doi.org/10.1096/fj.12-217547>
- Ichiki, A.T., Gibson, L.A., Jago, T.L., Strickland, K.M., Johnson, D.L., Lange, R.D., Allebban, Z., 1996. Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J Leukoc Biol* 60, 37–43. <https://doi.org/10.1002/jlb.60.1.37>
- Ito, T., Teo, Y.V., Evans, S.A., Neretti, N., Sedivy, J.M., 2018. Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Reports* 22, 3480–3492. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.002>
- Ivashkiv, L.B., Park, S.H., 2016. Epigenetic Regulation of Myeloid Cells. *Microbiol Spectr* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0010-2015>
- Jacobsen, J.A., Woodard, J., Mandal, M., Clark, M.R., Bartom, E.T., Sigvardsson, M., Kee, B.L., 2017. EZH2 Regulates the Developmental Timing of Effectors of the Pre-Antigen Receptor Checkpoints. *J.I.* 198, 4682–4691. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700319>

- Jeannin, P., Jaillon, S., Delneste, Y., 2008. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current Opinion in Immunology* 20, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.04.013>
- Jhunjunwala, S., van Zelm, M.C., Peak, M.M., Cutchin, S., Riblet, R., van Dongen, J.J.M., Grosveld, F.G., Knoch, T.A., Murre, C., 2008. The 3D Structure of the Immunoglobulin Heavy-Chain Locus: Implications for Long-Range Genomic Interactions. *Cell* 133, 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.024>
- Ji, H., Ehrlich, L.I.R., Seita, J., Murakami, P., Doi, A., Lindau, P., Lee, H., Aryee, M.J., Irizarry, R.A., Kim, K., Rossi, D.J., Inlay, M.A., Serwold, T., Karsunky, H., Ho, L., Daley, G.Q., Weissman, I.L., Feinberg, A.P., 2010. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature* 467, 338–342. <https://doi.org/10.1038/nature09367>
- Johnson, J.L., Georgakilas, G., Petrovic, J., Kurachi, M., Cai, S., Harly, C., Pear, W.S., Bhandoola, A., Wherry, E.J., Vahedi, G., 2018. Lineage-Determining Transcription Factor TCF-1 Initiates the Epigenetic Identity of T Cells. *Immunity* 48, 243-257.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.012>
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F., Rudensky, A.Y., 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 30, 531–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- Juergensmeyer, M.A., Juergensmeyer, E.A., Guikema, J.A., 1999. Long-term exposure to spaceflight conditions affects bacterial response to antibiotics. *Microgravity Sci Technol* 12, 41–47.
- Kacem, S., Feil, R., 2009. Chromatin mechanisms in genomic imprinting. *Mamm Genome* 20, 544–556. <https://doi.org/10.1007/s00335-009-9223-4>
- Kadmiel, M., Cidlowski, J.A., 2013. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 34, 518–530. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003>
- Kaiko, G.E., Horvat, J.C., Beagley, K.W., Hansbro, P.M., 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123, 326–338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x>
- Kamal, K.Y., Herranz, R., van Loon, J.J.W.A., Medina, F.J., 2018. Simulated microgravity, Mars gravity, and 2g hypergravity affect cell cycle regulation, ribosome biogenesis, and epigenetics in *Arabidopsis* cell cultures. *Sci Rep* 8, 6424. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24942-7>
- Kawao, N., Morita, H., Obata, K., Tamura, Y., Okumoto, K., Kaji, H., 2016. The vestibular system is critical for the changes in muscle and bone induced by hypergravity in mice. *Physiological Reports* 4, e12979. <https://doi.org/10.14814/phy2.12979>
- Kiecolt-Glaser, J.K., Glaser, R., Strain, E.C., Stout, J.C., Tarr, K.L., Holliday, J.E., Speicher, C.E., 1986. Modulation of cellular immunity in medical students. *J Behav Med* 9, 5–21. <https://doi.org/10.1007/BF00844640>
- Kiecolt-Glaser, J.K., Ricker, D., George, J., Messick, G., Speicher, C.E., Garner, W., Glaser, R., 1984. Urinary cortisol levels, cellular immunocompetency, and loneliness in

- psychiatric inpatients. *Psychosom Med* 46, 15–23. <https://doi.org/10.1097/00006842-198401000-00004>
- Kim, E., Kim, M., Woo, D.-H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rheey, J., Nakano, I., Lee, C., Joo, K.M., Rich, J.N., Nam, D.-H., Lee, J., 2013. Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell* 23, 839–852. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.008>
- Klaus, D.M., 2001. Clinostats and bioreactors. *Gravit Space Biol Bull* 14, 55–64.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., Kyewski, B., 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9, 833–844. <https://doi.org/10.1038/nri2669>
- Koaykul, C., Kim, M.-H., Kawahara, Y., Yuge, L., Kino-Oka, M., 2019. Maintenance of Neurogenic Differentiation Potential in Passaged Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Under Simulated Microgravity Conditions. *Stem Cells Dev* 28, 1552–1561. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0146>
- Kondo, K., Ohigashi, I., Takahama, Y., 2019. Thymus machinery for T-cell selection. *Int Immunol* 31, 119–125. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy081>
- Kooistra, S.M., Helin, K., 2012. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 297–311. <https://doi.org/10.1038/nrm3327>
- Krueger, A., Willenzon, S., Łyszkiewicz, M., Kremmer, E., Förster, R., 2010. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* 115, 1906–1912. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235721>
- Kuo, T.C., Schlissel, M.S., 2009. Mechanisms controlling expression of the RAG locus during lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 21, 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.03.008>
- Kurosaki, T., Kometani, K., Ise, W., 2015. Memory B cells. *Nat Rev Immunol* 15, 149–159. <https://doi.org/10.1038/nri3802>
- LaMere, S.A., Thompson, R.C., Meng, X., Komori, H.K., Mark, A., Salomon, D.R., 2017. H3K27 Methylation Dynamics during CD4 T Cell Activation: Regulation of JAK/STAT and IL12RB2 Expression by JMJD3. *J Immunol* 199, 3158–3175. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700475>
- Laouar, Y., Welte, T., Fu, X.-Y., Flavell, R.A., 2003. STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* 19, 903–912.
- Lee, D.U., Agarwal, S., Rao, A., 2002. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity* 16, 649–660. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00314-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00314-x)
- Lee, W.L., Harrison, R.E., Grinstein, S., 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection* 5, 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.014>

- Lennartsson, A., Ekwall, K., 2009. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta* 1790, 863–868. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.12.006>
- Lescale, C., Schenten, V., Djeghloul, D., Bennabi, M., Gaignier, F., Vandamme, K., Strazielle, C., Kuzniak, I., Petite, H., Dosquet, C., Fripiat, J.-P., Goodhardt, M., 2015. Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. *FASEB J* 29, 455–463. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259770>
- Lewis, M.L., Cubano, L.A., Zhao, B., Dinh, H.K., Pabalan, J.G., Piepmeier, E.H., Bowman, P.D., 2001. cDNA microarray reveals altered cytoskeletal gene expression in space-flown leukemic T lymphocytes (Jurkat). *FASEB J* 15, 1783–1785. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0820fje>
- Lewis, M.L., Reynolds, J.L., Cubano, L.A., Hatton, J.P., Lawless, B.D., Piepmeier, E.H., 1998. Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J* 12, 1007–1018.
- Li, H., Wen, Y., Wu, S., Chen, D., Luo, X., Xu, R., Ma, R., Wen, W., 2019. Epigenetic Modification of Enhancer of Zeste Homolog 2 Modulates the Activation of Dendritic Cells in Allergen Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 180, 120–127. <https://doi.org/10.1159/000500882>
- Li, Y., Mariuzza, R., 2013. Structural and Biophysical Insights into the Role of CD4 and CD8 in T Cell Activation. *Frontiers in Immunology* 4.
- Lin, J., Miller, M.J., Shaw, A.S., 2005. The c-SMAC: sorting it all out (or in). *The Journal of Cell Biology* 170, 177–182. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503032>
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A.H., Thomson, J.A., Ren, B., Ecker, J.R., 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315–322. <https://doi.org/10.1038/nature08514>
- Littman, D.R., Rudensky, A.Y., 2010. Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation. *Cell* 140, 845–858. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.021>
- Liu, J., Cao, X., 2015. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* 63, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.07.011>
- Liu, K., Victora, G.D., Schwickert, T.A., Guermónprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., Nussenzweig, M., 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392–397. <https://doi.org/10.1126/science.1170540>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C., 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Loh, J.T., Lim, T.J.F., Ikumi, K., Matoba, T., Janela, B., Gunawan, M., Toyama, T., Bunjamin, M., Ng, L.G., Poidinger, M., Morita, A., Ginhoux, F., Yamazaki, S., Lam, K.-P., Su, I.-H., 2018. Ezh2 Controls Skin Tolerance through Distinct Mechanisms in Different Subsets of Skin Dendritic Cells. *iScience* 10, 23–39. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.11.019>

- Lopez-Serra, L., Esteller, M., 2008. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer* 98, 1881–1885. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604374>
- Low, E.K., Brudvik, E., Kuhlman, B., Wilson, P.F., Almeida-Porada, G., Porada, C.D., 2018. Microgravity Impairs DNA Damage Repair in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells and Inhibits Their Differentiation into Dendritic Cells. *Stem Cells Dev.* 27, 1257–1267. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0052>
- Lu, H., Shimazaki, N., Raval, P., Gu, J., Watanabe, G., Schwarz, K., Swanson, P.C., Lieber, M.R., 2008. A biochemically defined system for coding joint formation in V(D)J recombination. *Mol Cell* 31, 485–497. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.029>
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., Flavell, R.A., 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 5598–5603. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400937101>
- Luo, H., Wang, C., Feng, M., Zhao, Y., 2014. Microgravity inhibits resting T cell immunity in an exposure time-dependent manner. *Int J Med Sci* 11, 87–96. <https://doi.org/10.7150/ijms.7651>
- Lutz, M.B., 2016. Induction of CD4(+) Regulatory and Polarized Effector/helper T Cells by Dendritic Cells. *Immune Netw* 16, 13–25. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.1.13>
- Lyman, S.D., Jacobsen, S.E.W., 1998. c-kit Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities. *Blood* 91, 1101–1134. <https://doi.org/10.1182/blood.V91.4.1101>
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., Lieber, M.R., 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781–794. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00671-2)
- Maccarrone, M., Battista, N., Meloni, M., Bari, M., Galleri, G., Pippia, P., Cogoli, A., Finazzi-Agrò, A., 2003. Creating conditions similar to those that occur during exposure of cells to microgravity induces apoptosis in human lymphocytes by 5-lipoxygenase-mediated mitochondrial uncoupling and cytochrome c release. *J Leukoc Biol* 73, 472–481. <https://doi.org/10.1189/jlb.0602295>
- Mahajan, K.N., Gangi-Peterson, L., Sorscher, D.H., Wang, J., Gathy, K.N., Mahajan, N.P., Reeves, W.H., Mitchell, B.S., 1999. Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13926–13931. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13926>
- Maldonado-López, R., De Smedt, T., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., Maliszewski, C.R., Moser, M., 1999. Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. *J Leukoc Biol* 66, 242–246. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.2.242>
- Maldonado-López, R., Maliszewski, C., Urbain, J., Moser, M., 2001. Cytokines Regulate the

- Capacity of CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ Dendritic Cells to Prime Th1/Th2 Cells In Vivo. *The Journal of Immunology* 167, 4345–4350. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4345>
- Malinczak, C.-A., Rasky, A.J., Fonseca, W., Schaller, M.A., Allen, R.M., Ptaschinski, C., Morris, S., Lukacs, N.W., 2020. Upregulation of H3K27 Demethylase KDM6 During Respiratory Syncytial Virus Infection Enhances Proinflammatory Responses and Immunopathology. *J.I.* 204, 159–168. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900741>
- Malu, S., Malshetty, V., Francis, D., Cortes, P., 2012. Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunol Res* 54, 233–246. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8329-z>
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O’Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., Weaver, C.T., 2006. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* 441, 231–234. <https://doi.org/10.1038/nature04754>
- Manicassamy, S., Pulendran, B., 2011. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol. Rev.* 241, 206–227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01015.x>
- Manna, S., Kim, J.K., Baugé, C., Cam, M., Zhao, Y., Shetty, J., Vacchio, M.S., Castro, E., Tran, B., Tessarollo, L., Bosselut, R., 2015. Histone H3 Lysine 27 demethylases Jmjd3 and Utx are required for T-cell differentiation. *Nat Commun* 6, 8152. <https://doi.org/10.1038/ncomms9152>
- Marchetti, M.C., Di Marco, B., Cifone, G., Migliorati, G., Riccardi, C., 2003. Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood* 101, 585–593. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1779>
- Margueron, R., Reinberg, D., 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature09784>
- Marín-Béjar, O., Mas, A.M., González, J., Martínez, D., Athie, A., Morales, X., Galduroz, M., Raimondi, I., Grossi, E., Guo, S., Rouzaut, A., Ulitsky, I., Huarte, M., 2017. The human lncRNA LINC-PINT inhibits tumor cell invasion through a highly conserved sequence element. *Genome Biol* 18, 202. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1331-y>
- Martin, F., Kearney, J.F., 2002. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 323–335. <https://doi.org/10.1038/nri799>
- Martin, F., Oliver, A.M., Kearney, J.F., 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617–629. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00129-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00129-7)
- Matthews, A.G.W., Kuo, A.J., Ramón-Maiques, S., Han, S., Champagne, K.S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D., Cheung, P., Ciccone, D.N., Walter, K.L., Utz, P.J., Shi, Y., Kutateladze, T.G., Yang, W., Gozani, O., Oettinger, M.A., 2007. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* 450, 1106–1110. <https://doi.org/10.1038/nature06431>
- McCarthy, N.E., Eberl, M., 2018. Human $\gamma\delta$ T-Cell Control of Mucosal Immunity and

- Inflammation. *Front Immunol* 9, 985. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00985>
- Mehta, S.K., Laudenslager, M.L., Stowe, R.P., Crucian, B.E., Feiveson, A.H., Sams, C.F., Pierson, D.L., 2017. Latent virus reactivation in astronauts on the international space station. *NPJ Microgravity* 3, 11. <https://doi.org/10.1038/s41526-017-0015-y>
- Mehta, S.K., Laudenslager, M.L., Stowe, R.P., Crucian, B.E., Sams, C.F., Pierson, D.L., 2014. Multiple latent viruses reactivate in astronauts during Space Shuttle missions. *Brain Behav. Immun.* 41, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.05.014>
- Melillo, J.A., Song, L., Bhagat, G., Blazquez, A.B., Plumlee, C.R., Lee, C., Berin, C., Reizis, B., Schindler, C., 2010. Dendritic cell (DC)-specific targeting reveals Stat3 as a negative regulator of DC function. *J. Immunol.* 184, 2638–2645. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902960>
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., Mattick, J.S., 2009. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 10, 155–159. <https://doi.org/10.1038/nrg2521>
- Mildner, A., Jung, S., 2014. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 40, 642–656. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016>
- Miller, A.H., Spencer, R.L., Pearce, B.D., Pisell, T.L., Azrieli, Y., Tanapat, P., Moday, H., Rhee, R., McEwen, B.S., 1998. Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. *Cell Immunol* 186, 45–54. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1293>
- Mills, P.J., Berry, C.C., Dimsdale, J.E., Ziegler, M.G., Nelesen, R.A., Kennedy, B.P., 1995. Lymphocyte subset redistribution in response to acute experimental stress: effects of gender, ethnicity, hypertension, and the sympathetic nervous system. *Brain Behav Immun* 9, 61–69. <https://doi.org/10.1006/brbi.1995.1006>
- Miloud, T., Fiegler, N., Suffner, J., Hämmerling, G.J., Garbi, N., 2012. Organ-specific cellular requirements for in vivo dendritic cell generation. *J Immunol* 188, 1125–1135. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003920>
- Mirzaei, H.R., 2022. Adaptive Immunity, in: Rezaei, N. (Ed.), *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Elsevier, Oxford, pp. 39–55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00028-8>
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., Tabira, T., 2003. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119, 887–897. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00105-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00105-2)
- Mochizuki-Kashio, M., Mishima, Y., Miyagi, S., Negishi, M., Saraya, A., Konuma, T., Shinga, J., Koseki, H., Iwama, A., 2011. Dependency on the polycomb gene Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood* 118, 6553–6561. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340554>

- Momken, I., Stevens, L., Bergouignan, A., Desplanches, D., Rudwill, F., Chery, I., Zahariev, A., Zahn, S., Stein, T.P., Sebedio, J.L., Pujos-Guillot, E., Falempin, M., Simon, C., Coxam, V.V., Andrianjafiniony, T., Gauquelin-Koch, G., Picquet, F., Blanc, S., 2011. Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. *FASEB Journal* 25, epub ahead of print. <https://doi.org/10.1096/fj.10-177295>
- Monici, M., Basile, V., Bellik, L., Fusi, F., Marziliano, N., Parenti, A., Romano, G., Conti, A., 2007. Does the exposure to microgravity affect dendritic cell maturation from monocytes? *Microgravity Science and Technology* 19, 187–190. <https://doi.org/10.1007/BF02919479>
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., Kupfer, A., 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82–86. <https://doi.org/10.1038/25764>
- Mørch, A.M., Bálint, Š., Santos, A.M., Davis, S.J., Dustin, M.L., 2020. Coreceptors and TCR Signaling – the Strong and the Weak of It. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.
- Moreno-Villanueva, M., Wong, M., Lu, T., Zhang, Y., Wu, H., 2017. Interplay of space radiation and microgravity in DNA damage and DNA damage response. *npj Microgravity* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41526-017-0019-7>
- Musumeci, A., Lutz, K., Winheim, E., Krug, A.B., 2019. What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity. *Frontiers in Immunology* 10.
- Nagano, T., Fraser, P., 2009. Emerging similarities in epigenetic gene silencing by long noncoding RNAs. *Mamm Genome* 20, 557–562. <https://doi.org/10.1007/s00335-009-9218-1>
- Nagaoka, H., Yu, W., Nussenzweig, M.C., 2000. Regulation of RAG expression in developing lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 12, 187–190. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(99\)00070-9](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)00070-9)
- Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O’Keeffe, M., Shortman, K., 2006. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.* 7, 663–671. <https://doi.org/10.1038/ni1340>
- Nakahara, T., Uchi, H., Urabe, K., Chen, Q., Furue, M., Moroi, Y., 2004. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int. Immunol.* 16, 1701–1709. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh171>
- Nakano, H., Yanagita, M., Gunn, M.D., 2001. Cd11c+B220+Gr-1+ Cells in Mouse Lymph Nodes and Spleen Display Characteristics of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine* 194, 1171–1178. <https://doi.org/10.1084/jem.194.8.1171>
- Naliboff, B.D., Benton, D., Solomon, G.F., Morley, J.E., Fahey, J.L., Bloom, E.T., Makinodan, T., Gilmore, S.L., 1991. Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress. *Psychosom Med* 53, 121–132.

<https://doi.org/10.1097/00006842-199103000-00002>

- Napoli, S., Pastori, C., Magistri, M., Carbone, G.M., Catapano, C.V., 2009. Promoter-specific transcriptional interference and c-myc gene silencing by siRNAs in human cells. *EMBO J* 28, 1708–1719. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.139>
- Newman, D.J., 2000. Life in extreme environments: how will humans perform on Mars? *Gravit Space Biol Bull* 13, 35–47.
- Nutt, S.L., Keenan, C., Chopin, M., Allan, R.S., n.d. EZH2 function in immune cell development 24.
- Ohira, T., Ino, Y., Nakai, Y., Morita, H., Kimura, A., Kurata, Y., Kagawa, H., Kimura, M., Egashira, K., Moriya, S., Hiramatsu, K., Kawakita, M., Kimura, Y., Hirano, H., 2020. Proteomic analysis revealed different responses to hypergravity of soleus and extensor digitorum longus muscles in mice. *Journal of Proteomics* 217, 103686. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103686>
- Ohnishi, Y., Totoki, Y., Toyoda, A., Watanabe, T., Yamamoto, Y., Tokunaga, K., Sakaki, Y., Sasaki, H., Hohjoh, H., 2010. Small RNA class transition from siRNA/piRNA to miRNA during pre-implantation mouse development. *Nucleic Acids Res* 38, 5141–5151. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq229>
- Onnis, A., Baldari, C.T., 2019. Orchestration of Immunological Synapse Assembly by Vesicular Trafficking. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7.
- Ooi, S.K.T., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.-P., Allis, C.D., Cheng, X., Bestor, T.H., 2007. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448, 714–717. <https://doi.org/10.1038/nature05987>
- Outters, P., Jaeger, S., Zaarour, N., Ferrier, P., 2015. Chapter Eight - Long-Range Control of V(D)J Recombination & Allelic Exclusion: Modeling Views, in: Murre, C. (Ed.), *Advances in Immunology, Molecular Mechanisms That Orchestrate the Assembly of Antigen Receptor Loci*. Academic Press, pp. 363–413. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.08.002>
- Padro, C.J., Sanders, V.M., 2014. Neuroendocrine regulation of inflammation. *Seminars in Immunology, Making new connections: The intersection of neuroendocrine and immune regulation* 26, 357–368. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.003>
- Pan, J., Ju, D., Wang, Q., Zhang, M., Xia, D., Zhang, L., Yu, H., Cao, X., 2001. Dexamethasone inhibits the antigen presentation of dendritic cells in MHC class II pathway. *Immunol Lett* 76, 153–161. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(01\)00183-3](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(01)00183-3)
- Panina-Bordignon, P., Mazzeo, D., Lucia, P.D., D'Ambrosio, D., Lang, R., Fabbri, L., Self, C., Sinigaglia, F., 1997. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest* 100, 1513–1519. <https://doi.org/10.1172/JCI119674>
- Patel, P.D., Lopez, J.F., Lyons, D.M., Burke, S., Wallace, M., Schatzberg, A.F., 2000. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *J Psychiatr Res* 34, 383–392. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(00\)00035-2](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(00)00035-2)

- Paul, S., Lal, G., 2017. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 8, 1124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>
- Pecaut, M.J., Simske, S.J., Fleshner, M., 2000. Spaceflight induces changes in splenocyte subpopulations: effectiveness of ground-based models. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279, R2072–R2078. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.6.R2072>
- Persson, E.K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hägerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Håkansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., Agace, W.W., 2013. IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* 38, 958–969. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.009>
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515.
- Pierre, N., Appriou, Z., Gratas-Delamarche, A., Derbré, F., 2016. From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radic Biol Med* 98, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.028>
- Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M., Mellman, I., 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787–792. <https://doi.org/10.1038/42039>
- Pierson, D.L., Stowe, R.P., Phillips, T.M., Lugg, D.J., Mehta, S.K., 2005. Epstein-Barr virus shedding by astronauts during space flight. *Brain Behav Immun* 19, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.08.001>
- Pippia, P., Meloni, M.A., Cossu, G., Cogoli-Greuter, M., Cogoli, A., 1998. Cellular adhesion in neoplastic and syngeneic normal cells under altered gravitational conditions. *J Gravit Physiol* 5, P165-166.
- Portela, A., Esteller, M., 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28, 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>
- Proietto, A.I., O’Keeffe, M., Gartlan, K., Wright, M.D., Shortman, K., Wu, L., Lahoud, M.H., 2004. Differential production of inflammatory chemokines by murine dendritic cell subsets. *Immunobiology* 209, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.03.002>
- Pulendran, B., Palucka, K., Banchereau, J., 2001. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 293, 253–256. <https://doi.org/10.1126/science.1062060>
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C.L., Gold, M.R., Ricciardi-Castagnoli, P., 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* 188, 2175–2180.
- Reul, J.M.H.M., Kloet, E.R.D., 1985. Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain:

- Microdistribution and Differential Occupation. *Endocrinology* 117, 2505–2511. <https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505>
- Riol-Blanco, L., Sánchez-Sánchez, N., Torres, A., Tejedor, A., Narumiya, S., Corbí, A.L., Sánchez-Mateos, P., Rodríguez-Fernández, J.L., 2005. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol* 174, 4070–4080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.7.4070>
- Romani, N., Koide, S., Crowley, M., Witmer-Pack, M., Livingstone, A.M., Fathman, C.G., Inaba, K., Steinman, R.M., 1989. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 169, 1169–1178. <https://doi.org/10.1084/jem.169.3.1169>
- Rutishauser, R.L., Martins, G.A., Kalachikov, S., Chandele, A., Parish, I.A., Meffre, E., Jacob, J., Calame, K., Kaech, S.M., 2009. Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8+ T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties. *Immunity* 31, 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.014>
- Saint-Mezard, P., Chavagnac, C., Bosset, S., Ionescu, M., Peyron, E., Kaiserlian, D., Nicolas, J.-F., Bérard, F., 2003. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *J Immunol* 171, 4073–4080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.8.4073>
- Sakaguchi, S., Negishi, H., Asagiri, M., Nakajima, C., Mizutani, T., Takaoka, A., Honda, K., Taniguchi, T., 2003. Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 860–866. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01049-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01049-0)
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109–1118. <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1109>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., Hiltunen, M., Kauppinen, A., 2014. Histone demethylase Jumonji D3 (JMJD3/KDM6B) at the nexus of epigenetic regulation of inflammation and the aging process. *J Mol Med (Berl)* 92, 1035–1043. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1182-x>
- Samantara, K., Shiv, A., de Sousa, L.L., Sandhu, K.S., Priyadarshini, P., Mohapatra, S.R., 2021. A comprehensive review on epigenetic mechanisms and application of epigenetic modifications for crop improvement. *Environmental and Experimental Botany* 188, 104479. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104479>
- Samelson, L.E., 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol* 20, 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.092601.111357>
- Sastry, K.J., Nehete, P.N., Savary, C.A., 2001. Impairment of antigen-specific cellular immune responses under simulated microgravity conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*

- 37, 203–208. <https://doi.org/10.1007/BF02577530>
- Sathe, P., Shortman, K., 2008. The steady-state development of splenic dendritic cells. *Mucosal Immunol* 1, 425–431. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.56>
- Saul, A.N., Oberyszyn, T.M., Daugherty, C., Kusewitt, D., Jones, S., Jewell, S., Malarkey, W.B., Lehman, A., Lemeshow, S., Dhabhar, F.S., 2005. Chronic stress and susceptibility to skin cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 1760–1767. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji401>
- Savary, C.A., Graziuti, M.L., Przepiorka, D., Tomasovic, S.P., McIntyre, B.W., Woodside, D.G., Pellis, N.R., Pierson, D.L., Rex, J.H., 2001. Characteristics of human dendritic cells generated in a microgravity analog culture system. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 37, 216–222.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., Haslett, C., 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2, 965–975. <https://doi.org/10.1038/nri957>
- Savina, A., Amigorena, S., 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219, 143–156. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x>
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., Hoeffel, G., Malleret, B., Heiseke, A., Chew, S., Jardine, L., Purvis, H.A., Hilkens, C.M.U., Tam, J., Poidinger, M., Stanley, E.R., Krug, A.B., Renia, L., Sivasankar, B., Ng, L.G., Collin, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Honda, K., Haniffa, M., Ginhoux, F., 2013. IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38, 970–983. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.011>
- Schmidt, S., Nino-Castro, A., Schultze, J., 2012. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Frontiers in Immunology* 3.
- Schraml, B.U., Reis e Sousa, C., 2015. Defining dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 32, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.11.001>
- Schwarzenberg, M., Pippia, P., Meloni, M.A., Cossu, G., Cogoli-Greuter, M., Cogoli, A., 1998. Microgravity simulations with human lymphocytes in the free fall machine and in the random positioning machine. *J Gravit Physiol* 5, P23-26.
- Scollay, R., Bartlett, P., Shortman, K., 1984. T cell development in the adult murine thymus: changes in the expression of the surface antigens Ly2, L3T4 and B2A2 during development from early precursor cells to emigrants. *Immunol Rev* 82, 79–103. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1984.tb01118.x>
- Seckl, J.R., Dickson, K.L., Yates, C., Fink, G., 1991. Distribution of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNA expression in human postmortem hippocampus. *Brain Res* 561, 332–337. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91612-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91612-5)
- Segura, E., Amigorena, S., 2013. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* 34, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.06.001>
- Seiffert, K., Granstein, R.D., 2006. Neuroendocrine Regulation of Skin Dendritic Cells. *Annals*

- of the New York Academy of Sciences 1088, 195–206.
<https://doi.org/10.1196/annals.1366.011>
- Seiffert, K., Hosoi, J., Torii, H., Ozawa, H., Ding, W., Campton, K., Wagner, J.A., Granstein, R.D., 2002. Catecholamines inhibit the antigen-presenting capability of epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 168, 6128–6135.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.6128>
- Sellars, M., Huh, J.R., Day, K., Issuree, P.D., Galan, C., Gobeil, S., Absher, D., Green, M.R., Littman, D.R., 2015. Regulation of DNA methylation dictates Cd4 expression during the development of helper and cytotoxic T cell lineages. *Nat Immunol* 16, 746–754.
<https://doi.org/10.1038/ni.3198>
- Selye, H., 1974. *Stress without distress*, 1st edn. Lippincott Williams & Wilkin, Philadelphia.
- Sharma, S., Kelly, T.K., Jones, P.A., 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27–36.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>
- Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y.-J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G.-C., Orkin, S.H., 2008. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol. Cell* 32, 491–502.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.016>
- Sheng, J.A., Bales, N.J., Myers, S.A., Bautista, A.I., Roueifar, M., Hale, T.M., Handa, R.J., 2021. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Development, Programming Actions of Hormones, and Maternal-Fetal Interactions. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 14.
- Shi, L., Tian, H., Wang, P., Li, L., Zhang, Z., Zhang, J., Zhao, Y., 2021. Spaceflight and simulated microgravity suppresses macrophage development via altered RAS/ERK/NFκB and metabolic pathways. *Cell Mol Immunol* 18, 1489–1502.
<https://doi.org/10.1038/s41423-019-0346-6>
- Singh, K.P., Kumari, R., DuMond, J.W., 2010. Simulated microgravity-induced epigenetic changes in human lymphocytes. *J. Cell. Biochem.* 111, 123–129.
<https://doi.org/10.1002/jcb.22674>
- Sklar, L.S., Anisman, H., 1981. Stress and cancer. *Psychol Bull* 89, 369–406.
- Skok, J.A., Gisler, R., Novatchkova, M., Farmer, D., de Laat, W., Busslinger, M., 2007. Reversible contraction by looping of the Tcra and Tcrb loci in rearranging thymocytes. *Nat Immunol* 8, 378–387. <https://doi.org/10.1038/ni1448>
- Sleckman, B.P., Bassing, C.H., Hughes, M.M., Okada, A., D’Auteuil, M., Wehrly, T.D., Woodman, B.B., Davidson, L., Chen, J., Alt, F.W., 2000. Mechanisms that direct ordered assembly of T cell receptor beta locus V, D, and J gene segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7975–7980. <https://doi.org/10.1073/pnas.130190597>
- Smith, S.M., Vale, W.W., 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 8, 383–395.
- Soldevila, G., Licon, I., Salgado, A., Ramírez, M., Chávez, R., García-Zepeda, E., 2004. Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3.

- Immunology 112, 191–200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01863.x>
- Sotnezova, E.V., Markina, E.A., Andreeva, E.R., Buravkova, L.B., 2017. Myeloid Precursors in the Bone Marrow of Mice after a 30-Day Space Mission on a Bion-M1 Biosatellite. *Bull Exp Biol Med* 162, 496–500. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3647-8>
- Statello, L., Guo, C.-J., Chen, L.-L., Huarte, M., 2021. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Stein, T.P., Wade, C.E., 2005. Metabolic consequences of muscle disuse atrophy. *J Nutr* 135, 1824S–1828S. <https://doi.org/10.1093/jn/135.7.1824S>
- Steinman, R.M., Banchereau, J., 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449, 419–426. <https://doi.org/10.1038/nature06175>
- Steinman, R.M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P., Mellman, I., 1999. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Human Immunology* 60, 562–567. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(99\)00030-0](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(99)00030-0)
- Stephens, M.A.C., Wand, G., 2012. Stress and the HPA Axis. *Alcohol Res* 34, 468–483.
- Stepkowski, S.M., Phan, T., Zhang, H., Bilinski, S., Kloc, M., Qi, Y., Katz, S.M., Rutzky, L.P., 2006. Immature syngeneic dendritic cells potentiate tolerance to pancreatic islet allografts depleted of donor dendritic cells in microgravity culture condition. *Transplantation* 82, 1756–1763. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000250732.30273.9b>
- Straussman, R., Nejman, D., Roberts, D., Steinfeld, I., Blum, B., Benvenisty, N., Simon, I., Yakhini, Z., Cedar, H., 2009. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol* 16, 564–571. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1594>
- Su, I.-hsin, Dobenecker, M.-W., Dickinson, E., Oser, M., Basavaraj, A., Marqueron, R., Viale, A., Reinberg, D., Wülfing, C., Tarakhovskiy, A., 2005. Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* 121, 425–436. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.029>
- Sundaresan, A., Risin, D., Pellis, N.R., 2002. Loss of signal transduction and inhibition of lymphocyte locomotion in a ground-based model of microgravity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 38, 118–122. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2002\)038<0118:LOSTAI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2002)038<0118:LOSTAI>2.0.CO;2)
- Surh, C.D., Sprent, J., 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100–103. <https://doi.org/10.1038/372100a0>
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., Glimcher, L.H., 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655–669. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80702-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80702-3)
- Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., Shinkai, Y., 2008. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J* 27, 2681–2690. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.192>

- Tackett, N., Bradley, J.H., Moore, E.K., Baker, S.H., Minter, S.L., DiGiacinto, B., Arnold, J.P., Gregg, R.K., 2019. Prolonged exposure to simulated microgravity diminishes dendritic cell immunogenicity. *Sci Rep* 9, 13825. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50311-z>
- Taghon, T., Yui, M.A., Pant, R., Diamond, R.A., Rothenberg, E.V., 2006. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 24, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.012>
- Tascher, G., Gerbaix, M., Maes, P., Chazarin, B., Ghislin, S., Antropova, E., Vassilieva, G., Ouzren-Zarhloul, N., Gauquelin-Koch, G., Vico, L., Fripiat, J.-P., Bertile, F., 2019. 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* 33, 3772–3783. <https://doi.org/10.1096/fj.201801463R>
- Tateishi, R., Akiyama, N., Miyauchi, M., Yoshinaga, R., Sasanuma, H., Kudo, T., Shimbo, M., Shinohara, M., Obata, K., Inoue, J., Shirakawa, M., Shiba, D., Asahara, H., Yoshida, N., Takahashi, S., Morita, H., Akiyama, T., 2015. Hypergravity Provokes a Temporary Reduction in CD4+CD8+ Thymocyte Number and a Persistent Decrease in Medullary Thymic Epithelial Cell Frequency in Mice. *PLoS ONE* 10, e0141650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141650>
- Thirsk, R., Kuipers, A., Mukai, C., Williams, D., 2009. The space-flight environment: the International Space Station and beyond. *CMAJ* 180, 1216–1220. <https://doi.org/10.1503/cmaj.081125>
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581. <https://doi.org/10.1038/302575a0>
- Trinchieri, G., 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133–146. <https://doi.org/10.1038/nri1001>
- Trombetta, E.S., Mellman, I., 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23, 975–1028. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538>
- Tsagaratou, A., Äijö, T., Lio, C.-W.J., Yue, X., Huang, Y., Jacobsen, S.E., Lähdesmäki, H., Rao, A., 2014. Dissecting the dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in T-cell development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E3306–E3315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412327111>
- Tumes, D.J., Onodera, A., Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., Motohashi, S., Nakayama, T., 2013. The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4(+) T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity* 39, 819–832. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.09.012>
- Uehara, S., Grinberg, A., Farber, J.M., Love, P.E., 2002. A Role for CCR9 in T Lymphocyte Development and Migration. *The Journal of Immunology* 168, 2811–2819. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.6.2811>
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H.D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd,

- R.L., Takahama, Y., 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* 200, 493–505. <https://doi.org/10.1084/jem.20040643>
- Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10, 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Verhaar, A.P., Hoekstra, E., Tjon, A.S.W., Utomo, W.K., Deuring, J.J., Bakker, E.R.M., Muncan, V., Peppelenbosch, M.P., 2014. Dichotomous effect of space flight-associated microgravity on stress-activated protein kinases in innate immunity. *Sci Rep* 4, 5468. <https://doi.org/10.1038/srep05468>
- Viswanathan, K., Daugherty, C., Dhabhar, F.S., 2005. Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. *Int Immunol* 17, 1059–1069. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh286>
- Vogel, J., Thiel, C.S., Tauber, S., Stockmann, C., Gassmann, M., Ullrich, O., 2019. Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and Genes of Related Pathways in Altered Gravity. *Int J Mol Sci* 20, E436. <https://doi.org/10.3390/ijms20020436>
- von Boehmer, H., 2005. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* 5, 571–577. <https://doi.org/10.1038/nri1636>
- Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F., Wolffe, A.P., 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 23, 62–66. <https://doi.org/10.1038/12664>
- Wang, C., Chen, H., Luo, H., Zhu, L., Zhao, Yang, Tian, H., Wang, R., Shang, P., Zhao, Yong, 2015. Microgravity activates p38 MAPK-C/EBP β pathway to regulate the expression of arginase and inflammatory cytokines in macrophages. *Inflamm. Res.* 64, 303–311. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0811-3>
- Webster Marketon, J.I., Glaser, R., 2008. Stress hormones and immune function. *Cellular Immunology, Neuroendocrine Regulation of Immune Function* 252, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.09.006>
- Wei, X.-C., Kishi, H., Jin, Z.-X., Zhao, W.-P., Kondo, S., Matsuda, T., Saito, S., Muraguchi, A., 2002. Characterization of Chromatin Structure and Enhancer Elements for Murine Recombination Activating Gene-2. *The Journal of Immunology* 169, 873–881. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.873>
- Weikum, E.R., Knuesel, M.T., Ortlund, E.A., Yamamoto, K.R., 2017. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 159–174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.152>
- Weiss, A., Littman, D.R., 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263–274. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90334-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90334-4)
- Wilson, C.B., Rowell, E., Sekimata, M., 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9, 91–105. <https://doi.org/10.1038/nri2487>
- Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., Villadangos, J.A., 2003. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically

- and functionally immature. *Blood* 102, 2187–2194. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0513>
- Winders, B.R., Schwartz, R.H., Bruniquel, D., 2004. A distinct region of the murine IFN-gamma promoter is hypomethylated from early T cell development through mature naive and Th1 cell differentiation, but is hypermethylated in Th2 cells. *J Immunol* 173, 7377–7384. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.12.7377>
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V.S., Davoust, J., Ricciardi-Castagnoli, P., 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185, 317–328.
- Woods, C.C., Banks, K.E., Gruener, R., DeLuca, D., 2003. Loss of T cell precursors after spaceflight and exposure to vector-averaged gravity. *FASEB J* 17, 1526–1528. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0749fje>
- Woods, C.C., Banks, K.E., Lebsack, T.W., White, T.C., Anderson, G.A., Maccallum, T., Gruener, R., DeLuca, D., 2005. Use of a microgravity organ culture dish system to demonstrate the signal dampening effects of modeled microgravity during T cell development. *Dev Comp Immunol* 29, 565–582. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.09.006>
- Wuest, S.L., Richard, S., Kopp, S., Grimm, D., Egli, M., 2015. Simulated Microgravity: Critical Review on the Use of Random Positioning Machines for Mammalian Cell Culture. *BioMed Research International* 2015, e971474. <https://doi.org/10.1155/2015/971474>
- Yang, F., Deng, X., Ma, W., Berletch, J.B., Rabaia, N., Wei, G., Moore, J.M., Filippova, G.N., Xu, J., Liu, Y., Noble, W.S., Shendure, J., Disteche, C.M., 2015. The lncRNA Firre anchors the inactive X chromosome to the nucleolus by binding CTCF and maintains H3K27me3 methylation. *Genome Biol* 16, 52. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0618-0>
- Yao, Y., Hu, H., Yang, Y., Zhou, G., Shang, Z., Yang, X., Sun, K., Zhan, S., Yu, Z., Li, P., Pan, G., Sun, L., Zhu, X., He, S., 2016. Downregulation of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) is essential for the Induction of Autophagy and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Genes* 7, 83. <https://doi.org/10.3390/genes7100083>
- Yates, A.J., 2014. Theories and quantification of thymic selection. *Front Immunol* 5, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00013>
- Yélamos, J., Monreal, Y., Saenz, L., Aguado, E., Schreiber, V., Mota, R., Fuente, T., Minguela, A., Parrilla, P., de Murcia, G., Almarza, E., Aparicio, P., Ménissier-de Murcia, J., 2006. PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. *EMBO J* 25, 4350–4360. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601301>
- Yi, L., Li, Z., Hu, T., Liu, J., Li, N., Cao, X., Liu, S., 2020. Intracellular HSP70L1 inhibits human dendritic cell maturation by promoting suppressive H3K27me3 and H2AK119Ub1 histone modifications. *Cell Mol Immunol* 17, 85–94. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0195-8>
- Zhan, Y., Carrington, E.M., van Nieuwenhuijze, A., Bedoui, S., Seah, S., Xu, Y., Wang, N.,

- Mintern, J.D., Villadangos, J.A., Wicks, I.P., Lew, A.M., 2011. GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8⁺ spleen dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 2585–2595. <https://doi.org/10.1002/eji.201141540>
- Zhang, J.A., Mortazavi, A., Williams, B.A., Wold, B.J., Rothenberg, E.V., 2012. Dynamic Transformations of Genome-wide Epigenetic Marking and Transcriptional Control Establish T Cell Identity. *Cell* 149, 467–482. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.056>
- Zhang, X., Ulm, A., Somineni, H.K., Oh, S., Weirauch, M.T., Zhang, H.-X., Chen, X., Lehn, M.A., Janssen, E.M., Ji, H., 2014. DNA methylation dynamics during ex vivo differentiation and maturation of human dendritic cells. *Epigenetics & Chromatin* 7, 21. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-21>
- Zhang, X., Wang, Y., Yuan, J., Li, N., Pei, S., Xu, J., Luo, X., Mao, C., Liu, J., Yu, T., Gan, S., Zheng, Q., Liang, Y., Guo, W., Qiu, J., Constantin, G., Jin, J., Qin, J., Xiao, Y., 2018. Macrophage/microglial Ezh2 facilitates autoimmune inflammation through inhibition of Socs3. *Journal of Experimental Medicine* 215, 1365–1382. <https://doi.org/10.1084/jem.20171417>
- Zhang, Z.-J., Guo, J.-S., Li, S.-S., Wu, X.-B., Cao, D.-L., Jiang, B.-C., Jing, P.-B., Bai, X.-Q., Li, C.-H., Wu, Z.-H., Lu, Y., Gao, Y.-J., 2018. TLR8 and its endogenous ligand miR-21 contribute to neuropathic pain in murine DRG. *The Journal of Experimental Medicine* 215, 3019–3037. <https://doi.org/10.1084/jem.20180800>
- Zhu, J., Yamane, H., Paul, W.E., 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28, 445–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T., Henikoff, S., 2007. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet* 39, 61–69. <https://doi.org/10.1038/ng1929>
- Zlotoff, D.A., Sambandam, A., Logan, T.D., Bell, J.J., Schwarz, B.A., Bhandoola, A., 2010. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* 115, 1897–1905. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-237784>
- ZOUALI, M., RICHARD, Y., 2011. Marginal Zone B-Cells, a Gatekeeper of Innate Immunity. *Frontiers in Immunology* 2.

Résumé

Avec l'effervescence de la conquête spatiale, le nombre et la durée des missions spatiales s'amplifient. Aujourd'hui, nous savons que les conditions extrêmes rencontrées dans l'espace ont un effet délétère sur l'organisme. Les changements de gravité constituent des stress qui impactent de nombreuses fonctions physiologiques comme le système immunitaire. Cependant, les effets de ces changements et les mécanismes moléculaires par lesquels ils affectent l'immunité sont encore peu connus. Dans ce contexte, nous avons étudié l'impact des modifications gravitaires sur les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes T (LT) murins.

En effet, bien que les DC soient essentielles à la réponse immunitaire, très peu d'études se sont intéressées à comprendre les effets des stress gravitaires sur ces cellules. Dans une première partie, nous avons montré que les DC exposées à un stress microgravitaire présentent un défaut de phénotype de maturation associé à une diminution de leur fonction de polarisation des LT CD4+ vers un profil Th1. L'étude des mécanismes impliqués dans ces altérations a permis de mettre en évidence un défaut d'activation de la voie de NF κ B ainsi que des modulations des mécanismes épigénétiques liés au couple EZH2/JMJD3 et à la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Notre étude a notamment montré que le niveau d'H3K27me3 est dérégulé par la microgravité et que l'expression d'EZH2 et de JMJD3 est aussi impactée. Dans une seconde partie, nous avons démontré qu'EZH2 et H3K27me3 sont importants dans la régulation du développement des LT. En effet, le thymus de souris exposées à l'hypergravité présente une modification du répertoire TCR β qui peut s'expliquer par des modifications d'H3K27me3 au niveau du locus TCR β et par l'implication d'EZH2 dans la régulation de la structure de la chromatine de ce locus.

Une meilleure compréhension des mécanismes menant à l'altération du système immunitaire par le stress gravitaire est importante, pour, à terme, permettre de développer des stratégies visant à limiter ses effets sur le système immunitaire lors des futurs voyages spatiaux.

Mots clés : cellules dendritiques, lymphocytes T, changements gravitaires, stress, vols spatiaux.

Abstract

With the effervescence of the space conquest, the number and the duration of space missions are increasing. Today, we know that extreme conditions encountered in space have a deleterious effect on the organism. Gravity changes constitute stresses that impact physiological functions and especially the immune system. However, effects of gravity changes on immunity and molecular mechanisms by which they affect it are still poorly understood. In this context, we studied the impact of gravity changes on murine dendritic cells (DC) and T lymphocytes (LT).

Despite the fact that DC are essential for the immune response, very few data about the impact of gravitational stresses on these cells exist. In this context, the first part of this thesis showed that microgravity impairs DC maturation phenotype and their function to drive Th1 polarization. These alterations seem to be linked to a NF κ B activation defect but could also be explained by epigenetic mechanism through the deregulation of EZH2/JMJD3 and H3K27me3. Our study showed that H3K27me3 is deregulated by microgravity and that EZH2 and JMJD3 are also impacted. In a second part, we showed that EZH2 and H3K27me3 are important for the regulation of LT development. Indeed, we showed that the thymus of hypergravity exposed mice presents modifications of the TCR β repertoire that is linked to H3K27me3 changes at the TCR β locus, and to the regulation of the chromatin structure of this locus by EZH2.

A better understanding of the mechanisms by which microgravity impairs the immune system will allow to develop strategies to limit its outcome during future spaceflights.

Keywords: dendritic cells, T lymphocytes, gravity changes, stress, spaceflights.