



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques de la Faculté des Sciences et Techniques
Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention Sciences de la Vie et de la Santé

par **Matthieu BASCOVE**

Etude du système immunitaire d'un amphibien et analyse des
effets de l'environnement sur sa réponse humorale

Soutenance le 17 décembre 2009

Membres du Jury :

Rapporteurs :	Mme Marie-Paule LEFRANC	Professeur, IMGT, UPR CNRS 1142, Université de Montpellier II
	Mme Sarah BAATOUT	Docteur, Laboratoire de Radiobiologie, SCK-CEN, Mol, Belgique
Examineurs :	Mme Marie-Christine BENE	Professeur, Laboratoire d'Immunologie, Université Henri Poincaré, Nancy Université
	M Eric TSCHIRHART	Professeur, Unité de Recherche en sciences de la Vie, Université du Luxembourg
	M Jean-Pol FRIPPIAT	Docteur, JE2537, Université Henri Poincaré, Nancy Université, directeur de thèse
	M Christian DOURNON	Professeur Emérite, Université Henri Poincaré, Nancy Université, co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier le Docteur Jean-Pol FRIPPAT pour m'avoir fait l'honneur de m'encadrer durant ma thèse et pour m'avoir donné sa confiance.

J'adresse également toute ma reconnaissance envers le Professeur Christian DOURNON pour avoir accepté de codiriger cette thèse.

Je remercie le Professeur Marie-Paule LEFRANC et le Docteur Sarah BAATOUT d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit et adresse également toute ma gratitude envers les Professeurs Marie-Christine BENE et Eric TSCHIRHART pour avoir accepté de participer à ce jury et d'examiner mon travail.

Ces travaux n'auraient pas pu voir le jour sans le soutien financier du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche, du centre national d'études spatiales et de l'agence spatiale européenne.

J'adresse toute ma sympathie envers le Docteur Christine LEGRAND FROSSI, le Docteur Bérénice SCHAERLINGER, le Docteur Cécile HVIN-SCHOHN, Christiane TANKOSIC, et Nathan GUEGUINO pour leur soutien technique, leur gentillesse et leurs conseils.

Je remercie le Professeur Stéphane FLAMENT ainsi que toute l'équipe EA3442 pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je remercie également toute ma famille pour m'avoir aidé financièrement et pour m'avoir remotivé quand c'était nécessaire.

Enfin, je tenais particulièrement à remercier Elodie pour me « supporter » depuis ces quatre années.

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. Les défenses de l'organisme contre les menaces externes.....	2
II. Les anticorps.....	3
II.1. Structure des anticorps.....	3
II.2. Création du répertoire primaire d'anticorps : la recombinaison V(D)J.....	4
II.2.1. Chronologie de la recombinaison V(D)J.....	5
II.2.1.1. Réarrangement des gènes de chaîne lourde.....	5
II.2.1.2. Réarrangement des gènes de chaîne légère	5
II.2.2. Le mécanisme de la recombinaison	6
II.2.3. Variabilité générée par la recombinaison V(D)J.....	9
II.3. Les structures canoniques des boucles constituant les sites de liaison à l'antigène ...	9
III. Les modifications somatiques des anticorps	10
III.1. Les mutations somatiques	10
III.2. La commutation de classe	12
III.3. Mécanisme de la maturation des anticorps	13
III.3.1. Points communs entre les hypermutations somatiques et la commutation de classe	13
III.3.2. La protéine AID	14
III.3.3. La régulation d'AID.....	15
III.3.3.1. Régulation transcriptionnelle	15
III.3.3.2. Régulation post-transcriptionnelle	17
III.3.3.3. Régulation post-traductionnelle	18
III.3.4. Autres facteurs impliqués dans les mécanismes d'hypermutation et de commutation de classe	20
III.3.5. Modèles possibles	21
III.3.5.1. Modèle de Schanz <i>et al</i>	21
III.3.5.2. Modèle par transcription inverse.....	23
IV. Phylogénie de la réponse humorale	23
IV.1. Apparition de la réponse immunitaire adaptative	23
IV.2. Les isotypes d'immunoglobulines chez les vertébrés	25
IV.3. Les répertoires de gènes VH	26
IV.4. Organisations des loci d'anticorps chez les vertébrés.....	27

IV.5. La recombinaison V(D)J dans les différentes classes de vertébrés	28
IV.6. Evolution de la commutation de classe et des hypermutations.....	29
IV.6.1. La commutation de classe chez les amphibiens et les poissons	30
IV.6.2. Les mutations somatiques chez les amphibiens et les poissons	31
V. Effet d'un vol spatial sur le système immunitaire	32
V.1. Croissance, résistance et virulence microbienne	33
V.2. Organes lymphoïdes et sous-populations cellulaires.....	33
V.3. Immunité innée.....	34
V.4. Immunité cellulaire.....	35
V.5. Immunité humorale	36
Publication 1 (<i>Journal of leukocyte biology</i>, 2009)	37
VI. Objectifs	38
RESULTATS	39
Partie 1 : Caractérisation des isotypes d'anticorps produits par <i>P. waltl</i>.	40
I. Introduction.....	40
II. Isotypes produits par le pleurodèle	40
III. Les IgP sont spécifiques au genre <i>Pleurodeles</i>	41
IV. Origine possible des IgP	42
V. Expression des isotypes de <i>P. waltl</i>	42
VI. Diversité des chaînes lourdes d'IgM et d'IgP	43
VII. Similitudes entre les cellules productrices d'IgP et les cellules B1 des mammifères ..	45
Publication 2 (<i>Molecular immunology</i>, 2008)	46
Partie 2 : Changements de l'expression des gènes VH après un séjour de longue durée dans l'espace.....	47
I. Introduction.....	47
II. Nombre de gènes VHII et VHVI présents dans le génôme de <i>P. waltl</i>	47
III. Gènes VH utilisés lors de la réponse humorale des animaux immunisés	47
IV. Expression individuelle des gènes VHVI	48
V. Variabilité des régions CDR3 des réarrangements VHII-D-JH	50
Publication 3 (<i>FASEB journal</i>, 2009)	51

Partie 3 : Caractérisation de l'ARNm d'AID chez le pleurodèle .52

I. Introduction.....	52
II. Découverte de l'ARNm d'AID chez <i>P. waltl</i> (pAID).....	52
III. La région 3'UTR du transcrit de pAID contient un site consensus pour le microRNA miR155.....	53
IV. Comparaison de pAID avec AID d'autres espèces.....	53
V. Expression de pAID durant le développement précoce du pleurodèle.....	54
VI. Profil d'expression de pAID chez le pleurodèle adulte	54
VII. Epissage alternatif de pAID.....	55

Publication 4 (*molecular immunology*, 2010).....57

Partie 4 : Etude de la maturation de l'affinité des anticorps après un séjour de longue durée dans l'espace (*non-publié*)58

I. Introduction.....	58
II. Résultats.....	58
II.1. séquençage du gène VHII utilisé pour produire les chaînes lourdes des IgM chez les animaux étudiés.....	58
II.2. Nature des mutations.	59
II.3. Fréquence des mutations	60
II.4. Quantification des transcrits d'AID.....	61
III. Discussion	62
III.1. Maturation de l'affinité des anticorps chez le pleurodèle	62
III.2. Effet du séjour dans l'espace sur la maturation de l'affinité des anticorps.....	64
III.3. Causes potentielles de la diminution des hypermutations dans l'espace	65

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES67

ANNEXE71

RÉFÉRENCES73

Abréviations

ADAR : **A**denosine **D**eaminase, **R**NA-specific
ADN : **A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique
ADNc : **A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique **c**omplémentaire
Ag : **A**ntigène
AID : **A**ctivation **I**nduced cytidine-**D**eaminase
ALL : **A**cute **L**ymphoblastic **L**eukemia
AMPc : **A**dénosine **M**onophosphate **c**yclique
APOBEC-1 : **A**P**O**lipoprotein **B** mRNA editing **E**nzyme, **C**atalytic polypeptide **1**
ARN : **A**cide **R**ibo**N**ucléique
ARNm : **A**cide **R**ibo**N**ucléique **m**essenger
BCR : **B**-Cell **R**eceptor
BER : **B**ase **E**xcision **R**epair
Blimp1 : **B** lymphocyte-induced **m**aturation **p**rotein **1**
C.S. : **C**anonical **S**tructure
C3B : **C**omplement component **3B**
CaM : **C**al**m**oduline
CD21R ; CR3d ; CR2 : **C**omplement component (3d/Epstein Barr virus) **R**eceptor **2**
CDR : **C**omplementarity **D**etermining **R**egion
Cellule NK : Cellule **N**atural **K**iller
CFU : **C**olony **F**orming **U**nit
CH : domaine **C**onstant de chaîne lourde (**H**eavy)
CL : domaine **C**onstant de chaîne légère (**L**ight)
CP : **C**onnecting **P**eptide
CRM1 : **C**hromosome **R**egion **M**aintenance **1**
CSR : **C**lass **S**witch **R**ecombination
D : segment de **D**iversité
DNA-PKc : **D**N**A**-activated, **P**rotein **K**inase catalytic polypeptide
DNP-KLH : **D**i**N**itro**P**henylated **K**eyhole **L**impet **H**emocyanin
EBV : **E**pstein **B**arr **V**irus
Ei-MAR : **E**nhancer intronique – **M**atrix **A**ttachement **R**egion
Exo 1 : **E**xonuclease **1**

FR : **F**ramework **R**egion
 GANP : **G**erminal center-**A**ssociated **N**uclear **P**rotein
 HEV : **H**igh **E**ndothelial **V**einule
 HoxC4 : **H**omeobox **C4**
 Id2 : **I**nhibitor of **D**N**A** binding **2**
 IFN : **I**nter**f**éron
 Ig : **I**mmunoglobuline
 IL : **I**nterleukine
 JH : domaine de **J**onction de chaîne lourde (**H**heavy)
 JL : domaine de **J**onction de chaîne légère (**L**light)
 KO : **K**nock **O**ut
 LMB : **L**eptomycine **B**
 LPS : **L**ipopolysaccharide
 LRR : **L**eucine **R**ich **R**egion
 LRRNT : **L**eucine **R**ich **R**egion **N**-Terminal
 Me : **M**ethyl
 MSH : **M**ut**S** **H**omolog
 NAR : **N**ew ou *Nurse shark* **A**ntigen **R**eceptor
 NES : **N**uclear **E**xport **S**ignal
 NFκB : **N**uclear **F**actor of **κ**appa light polypeptide gene enhancer in **B**-cells
 NLS : **N**uclear **L**ocalization **S**ignal
 PAX5 : **P**aired box **5**
 PCNA : **P**roliferating **C**ell **N**uclear **A**ntigen
 PCR : **P**olymerase **C**hain **R**eaction
 PKA : **P**rotein **K**inase **A**MP-activated
 Pol. : **P**olymér**é**rase
 RACE : **R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds
 RAG : **R**ecombination **A**ctivating **G**ene
 RPA : **R**eplication **P**rotein **A**
 RT : **R**everse **T**ranscription
 SHM : **S**omatic **H**yper**M**utations
 STAT6 : **S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription **6**
 Syndrome HIGM : syndrome **H**yper-**I**g**M**
 TdT : **T**erminal **d**eoxynucleotidyl **T**ransferase

TRS : **T**andem **R**epeat **S**equence

Ub : **U**biquitine

UTR : **U**ntranslated **r**egion

VH : domaine **V**ariable de chaîne lourde (**H**eavy)

VL : domaine **V**ariable de chaîne légère (**L**ight)

VL_R : **V**ariable **L**ymphocyte **R**eceptor

VZV : **V**aricella **Z**oster **V**irus

XRCC4 : **X**-ray **R**epair, **C**omplementing defective, repair in **C**hinese hamster cells **4**

INTRODUCTION

Durant ma thèse, j'ai abordé deux domaines de recherche. Le premier, plus fondamental, a été de mieux caractériser la réponse immunitaire humorale de *Pleurodeles waltl*. Dans le second, j'ai étudié les effets d'un séjour dans l'espace sur la réponse immunitaire humorale de cet animal. C'est pourquoi, dans mon introduction, j'expliquerai tout d'abord la réponse immunitaire humorale puis dans un second temps, j'évoquerai les effets connus d'un séjour dans l'espace sur le système immunitaire.

I. Les défenses de l'organisme contre les menaces externes

Un organisme est constamment en contact avec des éléments de l'environnement susceptible de menacer son intégrité. Les virus, les champignons, les parasites ou encore les bactéries font partie de ces menaces. La peau et les muqueuses représentent la première ligne de défense de l'organisme. La peau forme une barrière épithéliale solide et impénétrable, protégée par des cellules kératinisées. Les épithéliums qui tapissent le tube digestif et les voies respiratoires sont en continuité avec la peau mais sont plus vulnérables à l'infection. On les appelle des muqueuses car elles sont recouvertes par du mucus qu'elles sécrètent. Cette couche de mucus contient des enzymes, des glycoprotéines ou encore des protéoglycanes qui protègent les tissus. La rupture de ces barrières physiques suite à une lésion (une coupure par exemple) va rendre possible la pénétration de microbes dans les tissus sous-jacents. L'organisme va alors se défendre grâce à son système immunitaire qui va détecter les microbes grâce à la présence à leur surface de molécules caractéristiques reconnues comme étrangères à l'organisme hôte, appelés des **antigènes**, puis les détruire. Ces stimulations antigéniques peuvent induire différentes réponses, il existe donc différents types d'immunité (figure 1) :

- **L'immunité innée ou immunité naturelle** : elle comprend les premières lignes de défenses utilisées par le système immunitaire. C'est la première réaction du système immunitaire. Elle est non-spécifique et caractérisée principalement par l'intervention de cellules phagocytaires, tels que les monocytes du sang et les neutrophiles, et du système du complément. Lors d'une lésion tissulaire, une réaction inflammatoire va se produire ce qui va, entre autre, attirer les monocytes au site infectieux, où ils se différencieront en macrophages pour phagocyter l'agent étranger.
- **L'immunité adaptative ou immunité spécifique** : elle regroupe l'immunité cellulaire (médiée par les lymphocytes T) et l'immunité humorale (médiée par les anticorps sécrétés par les lymphocytes B). La réponse immunitaire spécifique permettra de reconnaître « l'intrus » par le biais de ses antigènes puis de le neutraliser soit

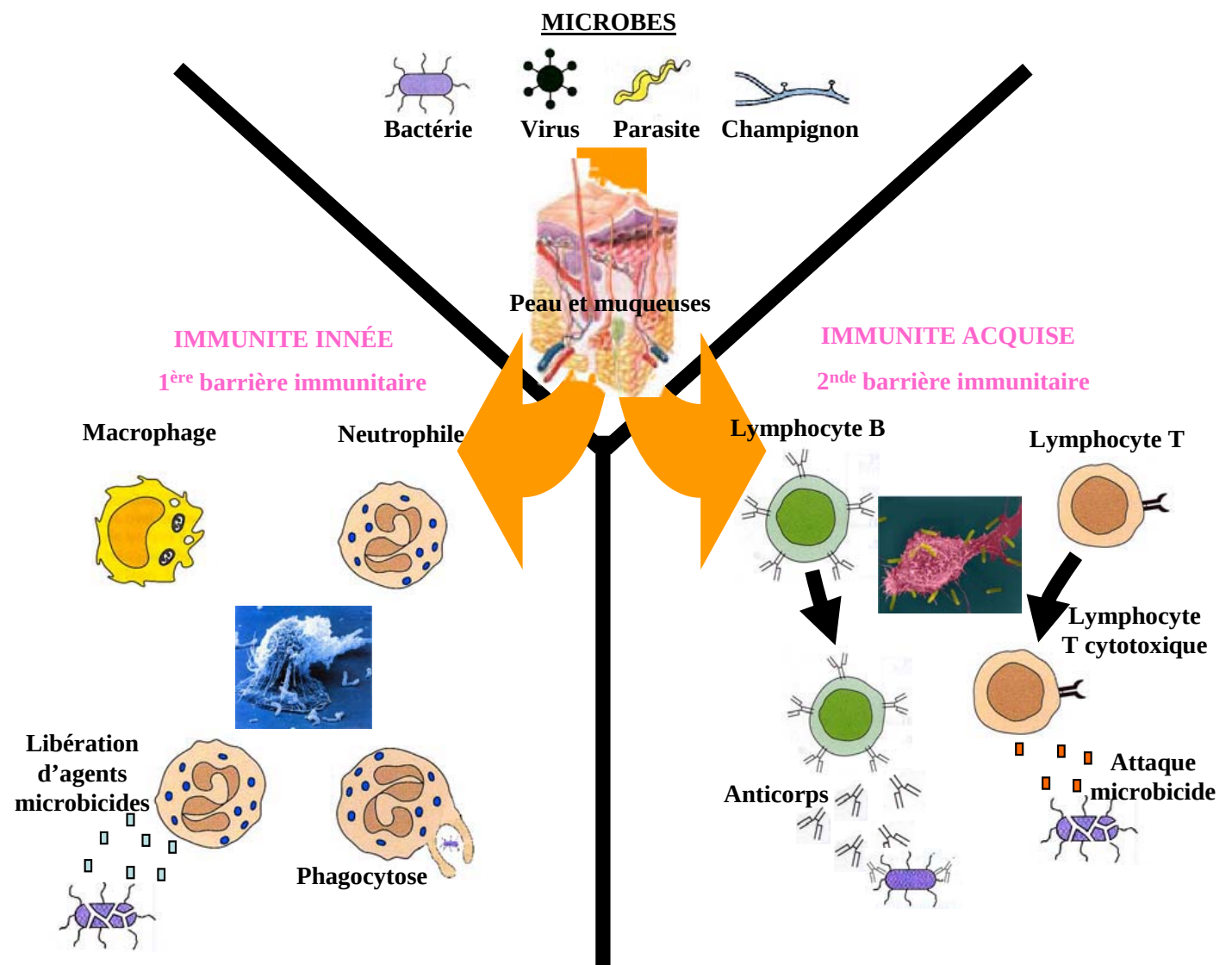


Figure 1 : Représentation schématique des différentes lignes de défense d'un organisme.

directement par le complément dont l'activation aboutit à la lyse microbienne, soit en facilitant sa phagocytose par les macrophages ou encore sa cytolyse par les cellules tueuses (cellules libérant des substances cytotoxiques après activation par les anticorps). Lors d'une infection, les lymphocytes vont se différencier en cellules effectrices à action immédiate ou en cellules mémoires, qui lors d'une infection ultérieure par le même organisme, seront directement sollicitées.

L'ensemble de ces cellules, appelées aussi **leucocytes**, et les organes lymphoïdes responsables de leur fabrication (moelle osseuse et thymus chez les mammifères) et participant à la réponse immunitaire (ganglions lymphatiques, rate, plaques de Peyer, et amygdales chez les mammifères) forment le système immunitaire (figure 2).

Ma thèse s'est portée principalement sur l'étude de la réponse immunitaire humorale du pleurodèle, c'est pourquoi seule cette partie sera détaillée ci-dessous.

II. Les anticorps

II.1. Structure des anticorps

Les anticorps, appelés aussi immunoglobulines, sont des glycoprotéines constitués de quatre chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (H pour heavy) identiques et 2 chaînes légères (L pour light) identiques (figure 3). Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Chacune est constituée d'un domaine variable (V), un domaine de jonction (J) et un (pour les chaînes légères) ou plusieurs (pour les chaînes lourdes) domaines constants (C). Les chaînes lourdes possèdent également un domaine de diversité (D) intercalé entre les domaines VH et JH. La variabilité de séquence des domaines V est concentrée en trois régions appelées des CDR (complementarity determining region). Ces CDR sont séparés par des régions d'ossatures appelées FR (framework region) qui sont plus conservées. Ce sont les trois CDR des chaînes lourdes et des chaînes légères qui vont former le site de liaison à l'antigène, appelé aussi **paratope** [1-3]. L'hypervariabilité des régions CDR permet la reconnaissance d'un grand nombre d'antigènes présents dans la nature.

Les régions constantes des chaînes lourdes définissent l'isotype de l'anticorps. Par exemple, chez les mammifères, il existe 5 isotypes d'anticorps : les IgG, IgA, IgM, IgD et IgE, chacun étant défini par une chaîne lourde particulière (appelées respectivement γ , α , μ , δ et ϵ). Les IgG et IgA sont également réparties en sous classes notées IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 et IgA2 (chaînes lourdes respectives γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α_1 et α_2). Le rôle biologique et le mode d'action de tous ces anticorps est différent. Les IgG, les anticorps les

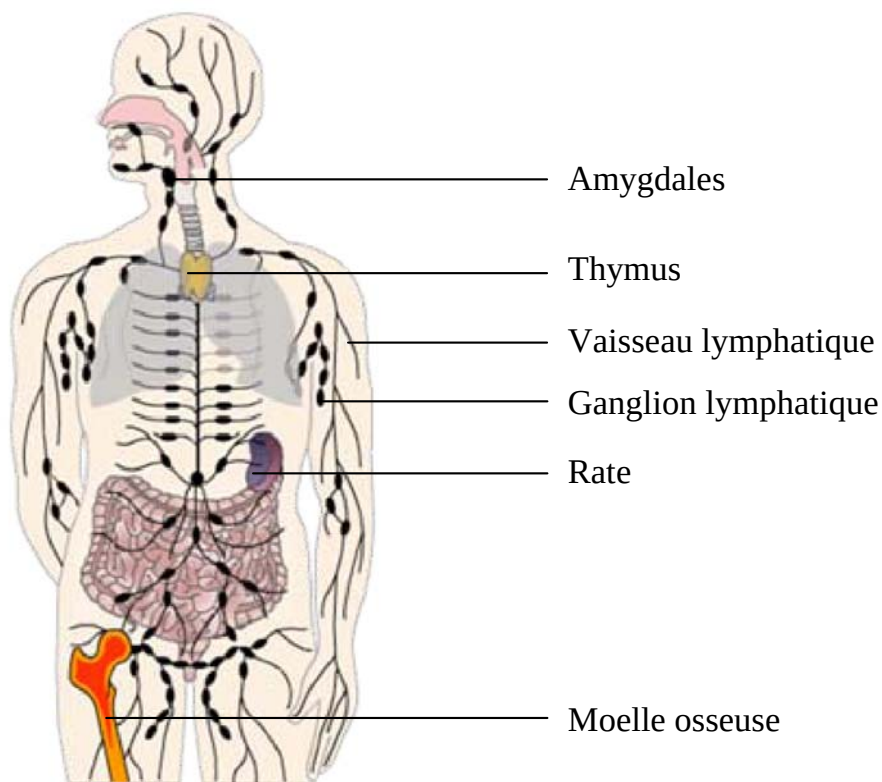


Figure 2 : Représentation anatomique des différents organes du système immunitaire.

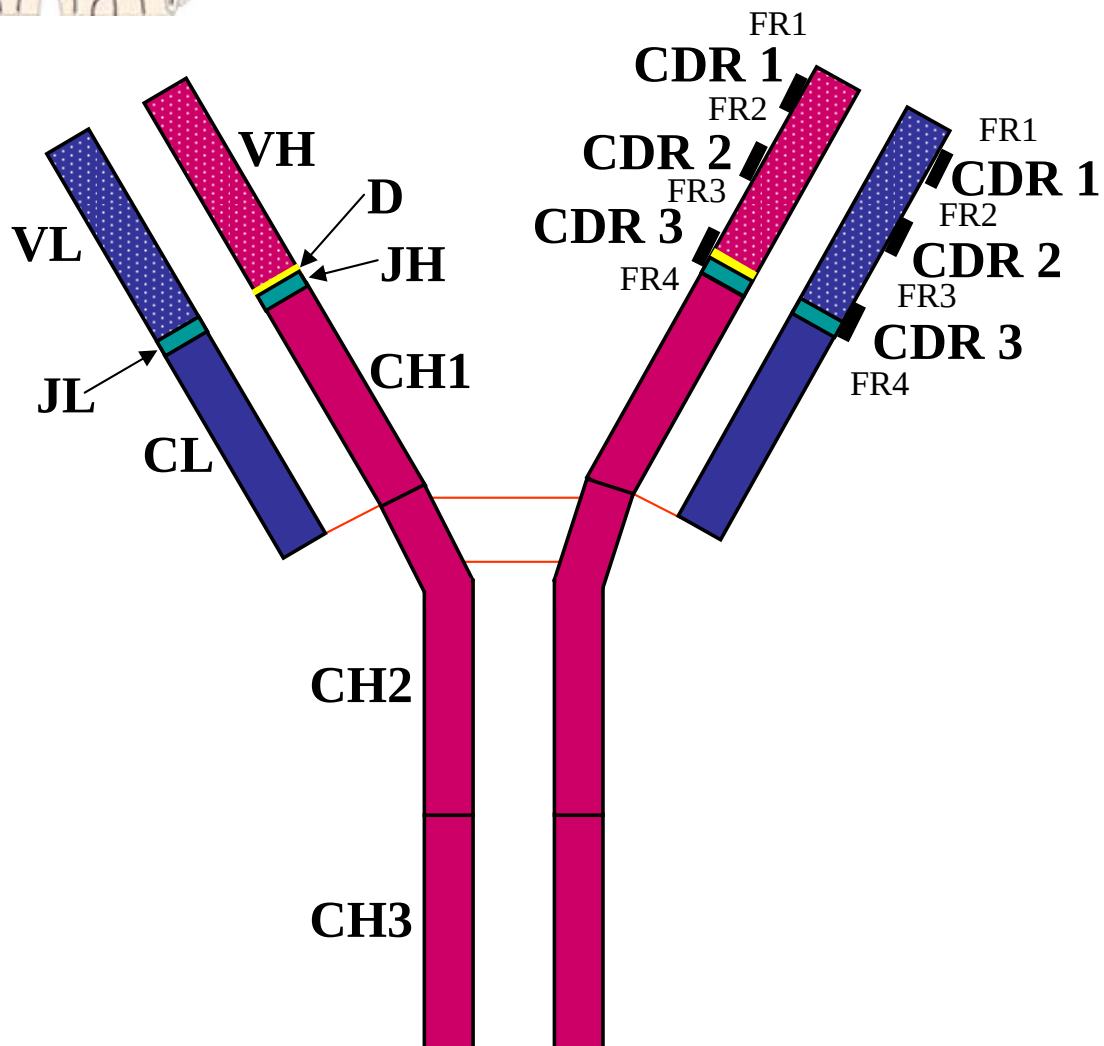


Figure 3: Structure d'un anticorps de type IgG. Les chaînes lourdes sont représentées en rouge. Les chaînes légères sont en bleu. VL: domaine variable des chaînes légères, VH: domaine variable des chaînes lourdes. CL: domaine constant des chaînes légères, CH: domaine constant des chaînes lourdes. D: segment de diversité. JL: segment de jonction des chaînes légères, JH: segment de jonction des chaînes lourdes. Les traits gras représentent les régions hypervariables de l'anticorps appelées CDR (complementarity determining regions). FR indique les régions d'ossature. Les ponts disulfures sont représentés par des traits rouges. Les diverses classes d'anticorps se différencient par la nature des domaines CH qui composent la chaîne lourde.

plus abondants, possèdent de nombreuses fonctions (neutralisation, facilitation de la phagocytose, sensibilisation à l'effet cytotoxique des cellules NK ou encore activation du complément). D'autres anticorps ont des capacités plus restreintes. Les IgM interviennent surtout dans l'activation du complément et les IgE interviennent plutôt dans la sensibilisation des mastocytes (cellules impliquées dans certaines allergies). Les IgA sont surtout localisées au niveau des muqueuses et ont une capacité de neutralisation. Quant aux IgD, leur rôle n'est pas encore défini. D'un point de vue structural, les IgG, IgD et IgE sont des monomères alors que les IgA sont capables de se dimériser et les IgM forment des pentamères. Tous ces anticorps peuvent être transmembranaires ou sécrétés. Les IgM transmembranaires sont les premiers anticorps fabriqués par les lymphocytes B naïfs avant une stimulation antigénique. Une fois stimulé, l'isotype de l'anticorps sera modifié en IgA, IgG, IgE ou IgM sécrétée afin d'être plus adapté pour l'élimination de l'antigène. Ce changement s'effectuera par la commutation de classe dont le mécanisme moléculaire sera décrit plus loin.

Concernant les chaînes légères, il en existe 2 types : kappa (κ) ou lambda (λ). Ces dernières sont communes aux 5 isotypes d'anticorps. Elles présentent entre elles environ 40% d'homologie. Les chaînes κ sont majoritaires, elles représentent 60% des chaînes légères totales pour l'ensemble des anticorps humains mais cela varie d'une espèce à l'autre (la souris exprime 95% de chaînes κ [4]).

Afin que le système immunitaire puisse reconnaître tous les microbes susceptibles de menacer l'organisme et produire les anticorps les plus adaptés à leur destruction, il est indispensable qu'il puisse fabriquer une très grande diversité d'anticorps mais aussi d'améliorer leur affinité au cours de la réponse humorale. Pour savoir comment l'organisme est capable de produire une aussi incroyable diversité de protéines, estimée chez les mammifères à un milliard, à partir d'un génome de quelques dizaines de milliers de gènes, certains chercheurs se sont appliqués à comprendre les mécanismes moléculaires de production des immunoglobulines.

II.2. Création du répertoire primaire d'anticorps : la recombinaison V(D)J

Tonegawa S. décrit en 1983 [5] le mécanisme de réarrangement génique mis en place dans les lymphocytes B afin de créer un nombre aussi variable de paratopes d'anticorps. L'information génétique d'une chaîne d'anticorps est en fait codée par de nombreux segments géniques séparés et qui constituent les loci IGH pour les chaînes lourdes, IGL pour les chaînes légères λ et IGK pour les chaînes légères κ . Par exemple, chez l'homme, le long du locus IGH

de chaîne lourde non-réarrangé, sont répartis environ 125 gènes VH (regroupés en 7 familles), 25 segments D et 6 segments JH [5-7] qui sont suivis par les exons codants les régions constantes. Chez l'homme, les loci IGH, IGK et IGL sont situés respectivement sur les chromosomes 14: 14q32; 2: 2p12 et 22: 22q11 [8-11]. Durant la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en lymphocytes B dans la moelle osseuse, ces segments géniques vont s'assembler par recombinaison pour former des gènes complets de chaîne lourde et de chaîne légère (figure 4).

II.2.1. Chronologie de la recombinaison V(D)J

II.2.1.1. Réarrangement des gènes de chaîne lourde

Les réarrangements géniques débutent, dans les précurseurs des cellules B, par le locus des gènes des chaînes lourdes. Dans un premier temps, un segment D va être associé avec un segment JH. Puis un des nombreux gènes VH va être associé à l'ensemble D-JH [12]. Si le réarrangement est fonctionnel, l'ensemble VH-D-JH est transcrit en ARN prémessager, puis les séquences d'ARN correspondant aux introns (et aux segments JH superflus) sont excisées par épissage de façon à produire un ARN messenger mature. Celui-ci est alors traduit en une chaîne lourde μ dans les cellules pré-B [5] (figure 4). Si le réarrangement initial ne peut être transcrit (réarrangement non productif ou abortif), il y a réarrangement du locus IGH sur le chromosome homologue [12]. Si le réarrangement initial est fonctionnel, la présence à la surface de la cellule B d'une chaîne lourde inhibe les réarrangements qui pourraient avoir lieu sur l'autre allèle. C'est le phénomène d'exclusion allélique [13, 14]. Ainsi, chaque cellule B n'exprimera qu'une seule sorte de chaîne lourde.

II.2.1.2. Réarrangement des gènes de chaîne légère

Si le réarrangement de la chaîne lourde est fonctionnel, le réarrangement des chaînes légères se produit. Un des gènes $V\kappa$ réarrange avec un des segments $J\kappa$ (figure 4) [15]. Si le réarrangement des chaînes légères κ est abortif sur les deux chromosomes, les gènes des chaînes légères λ réarrangent à leur tour [16, 17] (figure 4). Cependant, cette chronologie des réarrangements, κ avant λ , n'est pas absolue car des études de leucémies lymphoblastiques aiguës (ALL) [18] et de cellules B de moelle osseuse fœtale humaine [19] ont montré que les gènes du locus λ peuvent parfois réarranger en premier. De plus, il est intéressant de noter que les pourcentages de chaînes légères κ et λ exprimés chez l'homme et la souris sont corrélés aux nombres de gène $V\lambda$ et $V\kappa$ fonctionnels. En effet, l'homme possède 36 gènes $V\lambda$ et 46

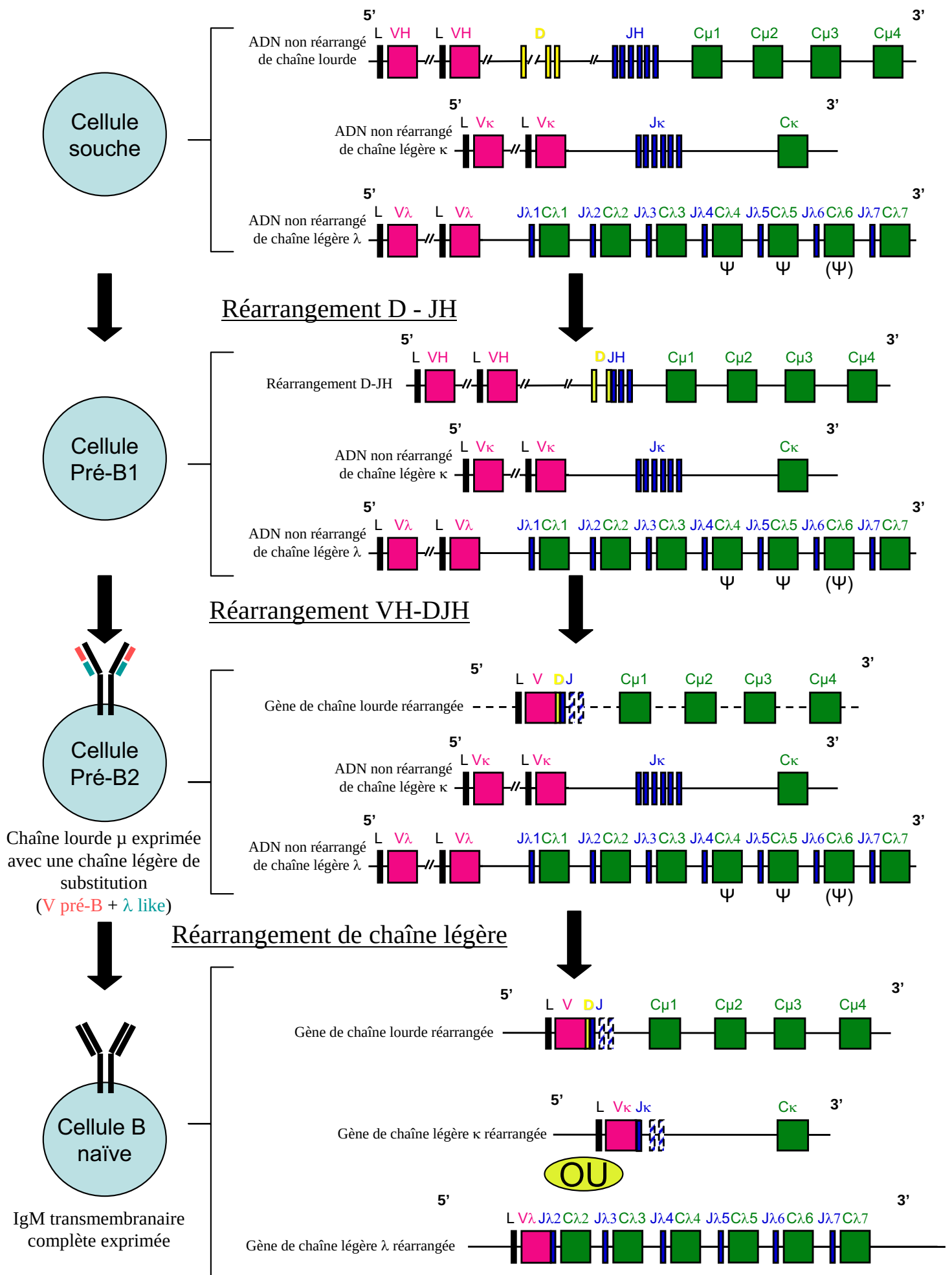


Figure 4 : Chronologie de la recombinaison V(D)J. Sur la gauche, sont représentées les différentes étapes du développement d'un lymphocyte B. Chez l'homme et la souris, les régions constantes des autres isotypes de chaînes lourdes sont situés en 3' des exons Cμ. Ψ signifie que le gène Cλ est un pseudogène. Pour Cλ6, cela dépend de l'haplotype, mais le plus fréquemment, c'est un pseudogène.

gènes $V\kappa$ fonctionnels et produit 40% de chaînes légères λ contre 60% de chaînes κ . De même la souris, qui possède seulement 3 gènes $V\lambda$ mais 75 gènes $V\kappa$ produit 5% de chaînes λ contre 95% de chaînes κ [4].

II.2.2. Le mécanisme de la recombinaison

Tant que les gènes codant les chaînes d'anticorps ne sont pas réarrangés ils ne sont pas fonctionnels. Cependant, les gènes VH sont transcrits [20] et cette transcription est nécessaire car elle va permettre d'apporter des modifications épigénétiques sur les histones au niveau des séquences à réarranger. En effet, les histones H3 et H4 seront acétylées [21-23] et la lysine 4 de l'histone H3 sera diméthylée ou triméthylée [22, 24]. Ces modifications vont ainsi permettre à la machinerie de recombinaison de se fixer au niveau des segments V, D ou J [25, 26]. De plus, ces modifications apparaissent d'abord au niveau des chaînes lourdes puis des chaînes κ et enfin auprès des chaînes λ [22, 23]. De ce fait, ces changements épigénétiques joueraient un rôle dans la chronologie des réarrangements. Il est également important de noter que certains éléments des répertoires V, D et J sont plus fréquemment recombinaisonnés que d'autres. Ce biais est également corrélé avec ces modifications épigénétiques [6, 21, 23, 25].

Une fois rendus accessibles, un complexe protéique, la recombinaison, reconnaît et se lie aux signaux de jonction situés en aval des gènes V, de part et d'autre des segments D et en amont des segments J (Figure 5). Ces signaux de jonction sont composés d'un heptamère, de séquence consensus CACAGTG, et d'un nonamère, de séquences consensus ACAAAAACC, séparés par un intervalle de 12 ± 1 ou 23 ± 1 nucléotides. Les signaux heptamère-nonamère en 3' des gènes V sont des séquences complémentaires des signaux heptamère-nonamère en 5' des segments J. Certains résidus de l'heptamère et du nonamère sont indispensables pour la recombinaison. Quant à l'intervalle, sa longueur est primordiale mais pas sa séquence [27]. Les réarrangements efficaces ont lieu lorsqu'ils font intervenir deux signaux de jonction dont l'un a un intervalle de 12 ± 1 nucléotides et l'autre de 23 ± 1 nucléotides entre l'heptamère et le nonamère (règle dite 12/23) [28]. Il se forme alors une boucle qui permet le rapprochement des segments d'ADN à recombinaison. Sous l'action de la recombinaison, il y a coupure du double brin d'ADN entre l'heptamère et le segment codant puis liaison des deux séquences signal (cela produit une "jonction de signaux") et liaison des deux extrémités codantes (cela produit une "jonction codante"). Les "jonctions codantes" peuvent contenir des délétions ou des additions de quelques nucléotides alors qu'il n'y a pas de modification lors de la création des "jonctions de signaux". Lorsque les gènes et segments sont dans la même orientation de

A



B

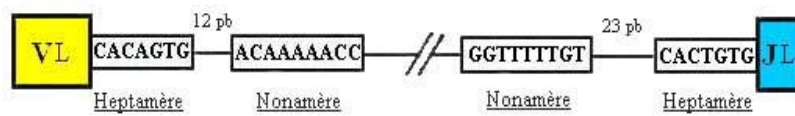


Figure 5: Représentation schématique des signaux de recombinaison des gènes des chaînes lourdes (A) et légères (B).

transcription, il y a excision de tout l'ADN situé entre les gènes et segments qui recombinaient (signaux de jonction compris) [29]. Si les gènes et segments sont en orientation de transcription opposée, le produit de la réaction est une inversion, et les deux signaux de jonction sont retrouvés dans le génome sans perte de matériel.

Plusieurs protéines sont impliquées dans le processus de recombinaison V(D)J. Certaines sont des composants typiquement lymphoïdes tels que RAG1 et RAG2 [30-32], d'autres sont des facteurs ubiquitaires. On peut citer la DNA-PKc (p350) [33], l'hétérodimère Ku70-Ku80 (complexe Ku) [34-36], Artemis [37], XRCC4 et la DNA ligase IV [38, 39]. Ces protéines sont impliquées dans la réparation des coupures double brin dans l'ADN et dans la recombinaison V(D)J. Des défauts dans ces facteurs peuvent conduire à une sensibilité accrue aux radiations et à une immunodéficiência.

RAG1 et RAG2 constituent la recombinase [40, 41]. Ces deux protéines reconnaissent les signaux de jonction, s'y attachent et collaborent pour introduire des coupures double-brin dans l'ADN entre les signaux de jonction et les segments codants (V, D, J) (Figure 6). Deux types d'extrémités sont alors obtenus : des extrémités franches au niveau des signaux de jonction et des extrémités en épingle à cheveux au niveau des segments codants. Après clivage, les protéines RAG1 et RAG2 restent liées aux extrémités d'ADN [42]. Ces dernières sont ensuite traitées par des protéines intervenant dans la réparation de l'ADN [43, 44]. La sous-unité catalytique de la DNA-PKc et l'hétérodimère Ku70-Ku80 s'associent et se lient aux extrémités d'ADN [44, 45]. La DNA-PKc va ensuite s'autophosphoryler ce qui va provoquer un changement de sa conformation. Ce changement va alors modifier l'orientation de l'ADN cible ce qui va le rendre accessible à Artemis [46]. Grâce à son activité endonucléase, cette protéine ouvre les extrémités codantes en épingle à cheveux [47]. La désoxynucléotidyl transférase terminale (TdT) et les polymérases μ et λ , toutes trois appartenant à la famille des polymérases X (Pol X), interviennent alors. Bien que ces trois polymérases aient des structures très proches [48], leurs rôles sont distincts et elles ne peuvent pas se remplacer entre elles [49]. En effet, la TdT ajoute des nucléotides aux jonctions VH-D et D-JH formant des régions dites *régions N* [50, 51]. La polymérase μ intervient lors du réarrangement des gènes des chaînes légères, mais pas des chaînes lourdes, à un stade où la TdT n'est plus exprimée [52]. Cette polymérase contribuerait à l'homogénéité de longueur des CDR3 des chaînes légères. Quant à la polymérase λ , elle est recrutée lors du réarrangement des gènes des chaînes lourdes avant que la TdT n'agisse [49]. La polymérase λ aurait pour fonction de maintenir une grande hétérogénéité de jonction dans les chaînes

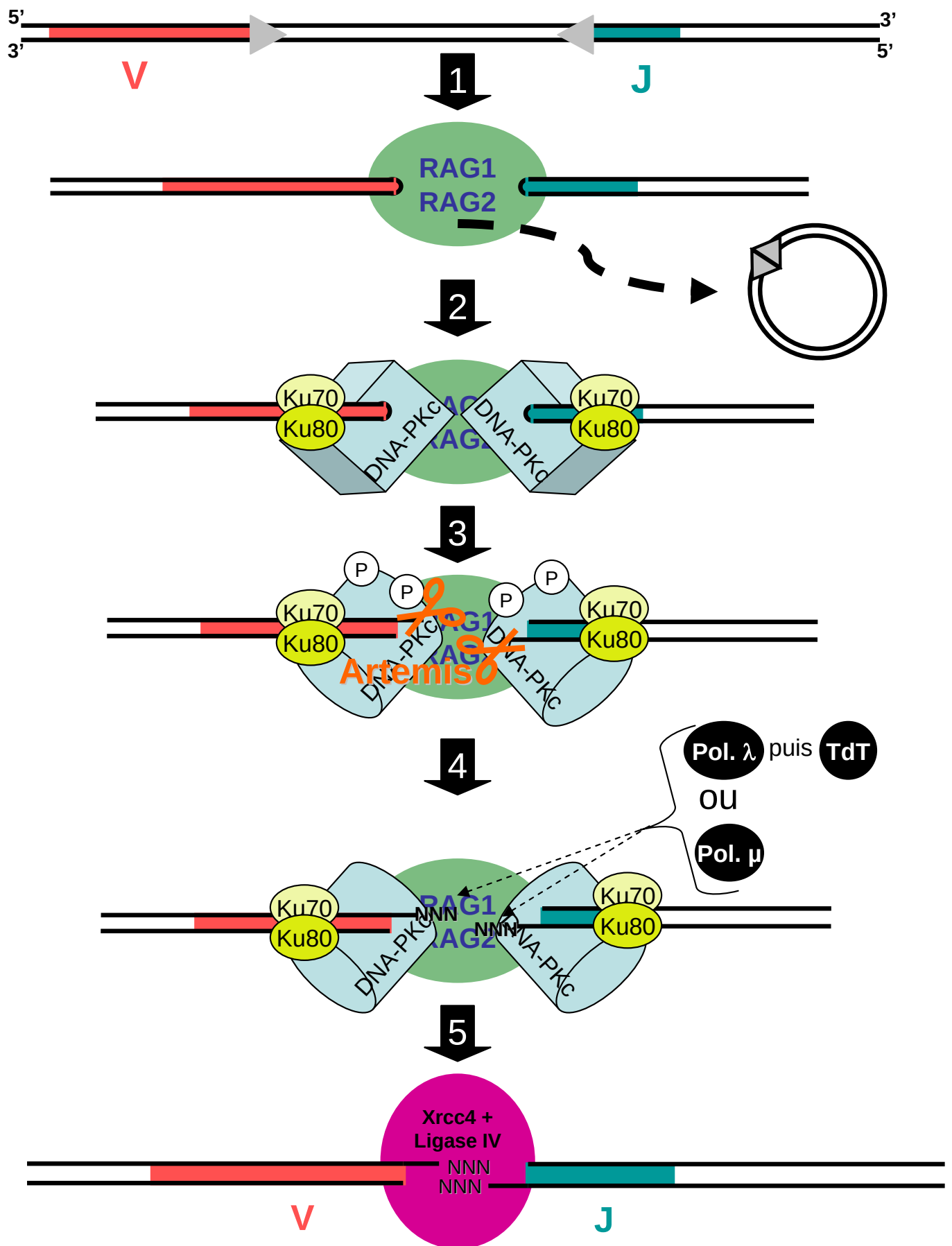


Figure 6 : Représentation schématique des principales étapes de la recombinaison V(D)J. 1) RAG1 et RAG2 s'attachent au signaux de recombinaison (triangles gris) et coupent la séquence entre ces derniers et la région codante. Les extrémités au niveau des signaux de recombinaison seront à bout franc alors qu'au niveau des segments codants, ce seront des épingles à cheveux. 2) Le complexe s'enrichit de l'hétérodimère Ku70/Ku80 puis de la DNA-PKc. 3) L'autophosphorylation de la DNA-PKc provoque un changement de conformation de la protéine ce qui permet à Artemis de cliver les épingles à cheveux. 4) Des polymérase de la famille polX vont ajouter aléatoirement des nucléotides dans le sens 5' → 3'. 5) Le complexe XRCC4-DNA ligase IV va joindre les segments d'ADN codants.

lourdes. Une fois que ces polymérases ont accompli leur fonction, le complexe XRCC4-DNA ligase IV relie les segments d'ADN codants [53].

Le lien entre ces différentes étapes est actuellement discuté. En effet, l'absence de nucléotides N dans les rares jonctions codantes trouvées chez des souris Ku80^{-/-} et dans des souris *scid* suggère que le l'hétérodimère Ku et/ou la DNA-PKc recrutent la TdT [54-56]. Cette hypothèse a été renforcée par une étude *in vitro* ayant montré que l'hétérodimère Ku peut interagir avec la partie N-terminal de la TdT dans des expériences de coimmunoprécipitation [57]. Plus récemment, des études biochimiques ont montré que la TdT et la polymérase μ peuvent être recrutées sur l'ADN *via* le complexe Ku-XRCC4-DNA ligase IV, mais que l'hétérodimère Ku seul ou le complexe XRCC4-DNA ligase IV seul n'en sont pas capables [58]. Par ailleurs, Mickelsen *et al* ont démontré que la DNA-PKc module *in vitro* le nombre et la nature des nucléotides ajoutés par la TdT, ce que le complexe Ku seul n'est pas capable de faire [59], suggérant ainsi que ce soit la DNA-PKc qui dirige la TdT durant la recombinaison V(D)J. Face à toutes ces observations, certains auteurs supposent que le complexe Ku, la DNA-PKc, XRCC4 et la DNA ligase IV seraient déjà liés entre eux dès le départ du processus de réparation [43, 44].

Récemment, il a été montré que la recombinaison du gène VH avec le produit DJH est affaiblie chez les souris KO pour le facteur de transcription Pax5 provoquant ainsi un arrêt du développement des lymphocytes B au stade préB1 [60, 61]. Ce dernier interagirait avec le complexe RAG1/RAG2 pour augmenter les clivages dans l'ADN créés par RAG1/RAG2 et ainsi faciliter la recombinaison. De plus, dans des cellules préB1 Pax5^{-/-}, une préférence est observée pour les réarrangements de gènes VH proches de l'ensemble DJH. Pax5 induirait donc une contraction de la chromatine pour permettre le réarrangement de gènes VH plus distants de l'ensemble DJH [62]. Enfin, Pax5 est exprimé tout le long de la vie des lymphocytes B (sauf chez les plasmocytes) et il a été montré que chez les souris Pax5^{-/-}, les cellules préB1 présentent un phénotype bien particulier : avec un stimulus approprié, ces cellules sont capables de se différencier en autres cellules hématopoïétiques comme des lymphocytes T ou des érythrocytes [60]. De plus, Pax5 est suffisant pour induire la recombinaison V(D)J dans des thymocytes [62]. Toutes ces données démontrent que Pax5 est donc un facteur clé de l'identité des lymphocytes B.

Il est également intéressant de noter que la recombinaison V(D)J des chaînes lourdes est étroitement liée à la voie de signalisation de l'interleukine 7 (IL-7). Cette voie permettrait l'hyperacétylation des histones au niveau des gènes qui doivent être recombinés rendant ainsi leur chromatine accessible au complexe RAG [6, 63]. De plus, l'arrêt de l'expression du

récepteur à l'IL-7 est étroitement lié à l'étape d'exclusion allélique [6]. Par ailleurs, l'IL-7 joue un rôle clé dans la survie de cellules précurseurs de la lignée lymphoïde et un défaut d'IL-7 ou d'un des composants de la voie de transduction (tels que γ_c et Jak3) provoque une sévère immunodéficiency chez la souris et chez l'homme [64-70].

II.2.3. Variabilité générée par la recombinaison V(D)J

La diversité créée par le processus de recombinaison V(D)J est donc due :

- au grand nombre de gènes V et de combinaisons VH-D-JH, V κ -J κ et V λ -J λ possibles. Par exemple, chez l'homme il existe 123 gènes VH. Quarante quatre de ces gènes possèdent une phase ouverte de lecture parmi lesquels 39 sont exprimés dans les chaînes lourdes. Il existe également 25 segments D et 6 segments JH fonctionnels. Ceci donne donc $39 \times 25 \times 6 = 5850$ combinaisons VDJ fonctionnelles possibles (ce nombre est théorique car il ne tient pas compte des variations alléliques) [7].
- à l'imprécision de la jonction par suite d'une flexibilité des sites de coupure, lesquels peuvent être observés à la limite même des séquences V, D et J ou être déplacés de 1 ou 2 nucléotides, créant ainsi une grande variabilité du CDR3 des chaînes.
- à la désoxynucléotidyl transférase terminale (TdT) qui ajoute des nucléotides aux jonctions VH-D et D-JH formant ainsi des régions dites *régions N*.
- à l'ouverture des extrémités codantes qui ont des structures en épingles à cheveux. Cette étape peut générer des structures palindromiques (éléments P) au niveau des jonctions.

II.3. Les structures canoniques des boucles constituant les sites de liaison à l'antigène

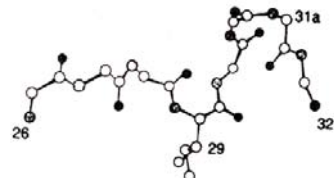
L'analyse de structures cristallographiques d'anticorps a permis d'identifier des résidus qui, par leur repliement, leur capacité à établir des liaisons hydrogènes ou leur capacité à assurer des angles de torsion inhabituels, sont responsables des conformations des régions hypervariables (les CDR) des structures analysées [71-73]. Ces conformations sont définies par une taille, exprimée en nombre d'acides aminés, et par les interactions de quelques résidus situés à des positions précises dans les régions hypervariables et dans les feuillet β constituant l'ossature de l'immunoglobuline.

Le répertoire de conformations des régions hypervariables des chaînes légères (boucles L1, L2 et L3) et des chaînes lourdes (boucles H1 et H2) est constitué d'un nombre restreint de structures discrètes appelées "structures canoniques". La table 1 présente, à titre d'exemple, les structures connues pour les boucles H1 et H2 formées à partir des CDR1 et 2 des gènes

La boucle H1		Position des acides aminés clés:					
Structures canoniques	Taille en nombre d'aa	24	26	27	29	34	94
C.S.1	7	S/A/V/G/T	G	Y/F/G	I/F/L/VF	M/I/K/V/W	R/T/A/K
C.S.2	8	F/V	G	F/Y/G	L/I	C/W	R/ H
C.S.3	9	F/V/G	G	F/G/M	L/I/VV	V/WW	R/H



C.S.1

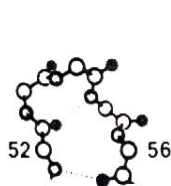


C.S.2

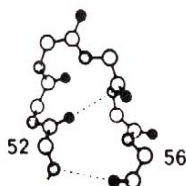
Représentation des structures canoniques C.S.1 et 2 de la boucle H1.

La boucle H2		Position des acides aminés clés:		
Structures canoniques	Taille en nombre d'aa	54	55	71
C.S.1	5	-	D/G	K/R/V/I
C.S.2	6	-	A/G/S/D/F	R/K/A/T/L/V/W
C.S.3	6	G/S/N/D/T	-	R/K
C.S.4	8	S	Y	R

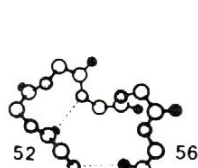
Note: le tiret indique que l'identité des résidus à ce site n'est pas importante pour la conformation.



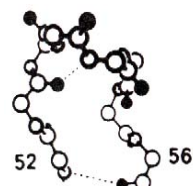
C.S.1



C.S.2



C.S.3



C.S.4

Représentation des structures canoniques C.S.1, 2, 3 et 4 de la boucle H2.

Table 1 : Structures canoniques des boucles H1 et H2 des régions VH (d'après Tramontano *et al* [73], Chothia *et al* [72] et Barré *et al* [76]). Il existe 7 structures canoniques possibles (C.S.1 à C.S.3 pour la boucle H1 et C.S.1 à C.S.4 pour la boucle H2). Ces différentes structures dépendent de la nature des acides aminés observés à des positions clés de la séquence protéique.

VH. Concernant la boucle H3, plusieurs études ont été réalisées sur cette boucle [74, 75]. Elle correspond aux résidus compris entre la cystéine 92 et la glycine 104, et se compose d'un torse et d'une tête. La région torse possède un répertoire de conformations limité alors que la tête de la boucle H3 a une grande variété de conformations. Une prédiction précise de la conformation du torse est possible dans la plupart des cas alors qu'une prédiction de la conformation de la tête n'est possible que dans certains cas. Ceci s'explique par le fait que cette boucle est codée par le CDR3 de la chaîne lourde qui comprend la fin du gène VH, le segment D et le début du segment JH (figure 3), c'est-à-dire le produit de la recombinaison VDJ. Ce CDR est donc hypervariable et c'est pour cette raison qu'il est difficile de prédire la conformation de la boucle H3. Néanmoins, certaines études ont révélé une corrélation entre la longueur de cette boucle et la nature de l'antigène reconnu [1, 2]. Les boucles les plus longues fixeraient préférentiellement des gros antigènes alors que des boucles plus courtes fixeraient plutôt des petits antigènes.

Le système des structures canoniques est intéressant car il permet de prédire les structures des régions hypervariables des immunoglobulines avant que leur structure cristallographique ne soit établie [72]. Les structures canoniques les plus communément observées chez l'homme se trouvent aussi chez les requins [76]. Ces structures sont donc apparues très tôt et ont été conservées au cours de l'évolution du système immunitaire, malgré une divergence importante de l'organisation des loci des immunoglobulines chez l'homme et les requins.

III. Les modifications somatiques des anticorps

A l'issue des réarrangements géniques qui s'effectuent au cours de la maturation des lymphocytes B, chaque cellule B va donc exprimer une Ig de surface qui lui permettra de reconnaître un antigène donné, c'est pourquoi cette Ig de surface est appelée BCR (récepteur à l'antigène du lymphocyte B). Chaque cellule B va ensuite migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour terminer sa maturation et éventuellement rencontrer son antigène. Le cas échéant, les anticorps vont subir de nouvelles modifications grâce à des mutations somatiques et à la commutation de classe qui vont respectivement augmenter l'affinité de l'anticorps pour son antigène et son efficacité d'élimination.

III.1. Les mutations somatiques

Les mutations somatiques, ou hypermutations, affectent spécifiquement les sites de liaison des anticorps et permettent d'améliorer considérablement l'affinité de l'anticorps pour

l'antigène [77]. Lorsque les cellules B rencontrent leur antigène dans les organes lymphoïdes secondaires, sous l'effet des cytokines produites par les lymphocytes T helper ayant eux-aussi reconnu l'antigène, elles se multiplient pour former un foyer primaire (figure 7A). Si le BCR a une forte affinité pour l'antigène, alors les cellules B se transforment en cellules sécrétrices d'anticorps, les plasmocytes, et en cellules B mémoire. Si par contre cette affinité est moins forte, les cellules B vont former des centres germinatifs (figure 7B) [78, 79] dans lesquels elles deviennent des centroblastes, cellules qui se divisent intensément. Au cours de ces divisions, des mutations ponctuelles vont être introduites spécifiquement dans les gènes VH et VL réarrangés codant pour l'anticorps. Les récepteurs mutés (Ig membranaires) sont ensuite exprimés par les centrocytes qui dérivent des centroblastes. Les centrocytes ne se divisent plus. Ceux qui portent les Ig les plus avides pour l'antigène, qui est à la surface des cellules dendritiques folliculaires, sont sélectionnés et deviennent soit des plasmocytes sécréteurs d'anticorps soit des cellules mémoire. Les autres centrocytes (plus de 95%) meurent par apoptose et sont phagocytés par les macrophages.

Les mutations somatiques correspondent principalement à des mutations ponctuelles dont les trois quarts induisent une modification de l'acide aminé codé. Le taux de mutation est estimé à 1 pour 1000 paires de bases/génération [77, 80], ce qui est 100 fois plus élevé que le taux observé pour des mutations spontanées. Elles sont concentrées en une zone, le domaine HYM, qui couvre environ 2 kb en aval du promoteur du gène V (figure 8). Diverses études basées sur l'analyse de transgènes d'Ig ont montré que le promoteur P, l'enhancer intronique Ei-MAR et l'enhancer en 3', E-3', sont nécessaires pour qu'il y ait hypermutations (figure 8) [81]. En effet, la délétion des enhancers abolit les mutations somatiques. Il existe donc un lien entre transcription et introduction des mutations. De plus, il a été montré que l'enhancer intronique Ei-MAR doit être dans l'orientation 5'→3' pour qu'il y ait hypermutation complète du transgène. Quant au promoteur, il peut être remplacé par d'autres qui dépendent également de la RNA polymérase II. Par contre, la force de ce promoteur est importante car la fréquence des mutations dépendra du taux d'ARN prémessager [80]. De plus, si on rajoute un promoteur en amont de l'exon C, il y aura hypermutation des 2 kb situés en aval de ce promoteur, c'est-à-dire de l'exon C [82]. Le promoteur constitue donc la borne 5' du domaine HYM. Cette expérience montre également que la séquence nucléotidique du domaine HYM n'est pas importante. D'ailleurs si on remplace le réarrangement par un exon quelconque ce dernier sera également hypermuté [83].

Les motifs RGYW (où R=A/G, Y=C/T, W=A/T) seraient les cibles préférentielles de la machinerie qui introduit les mutations [84]. Cependant, tous les tétramères répondants au

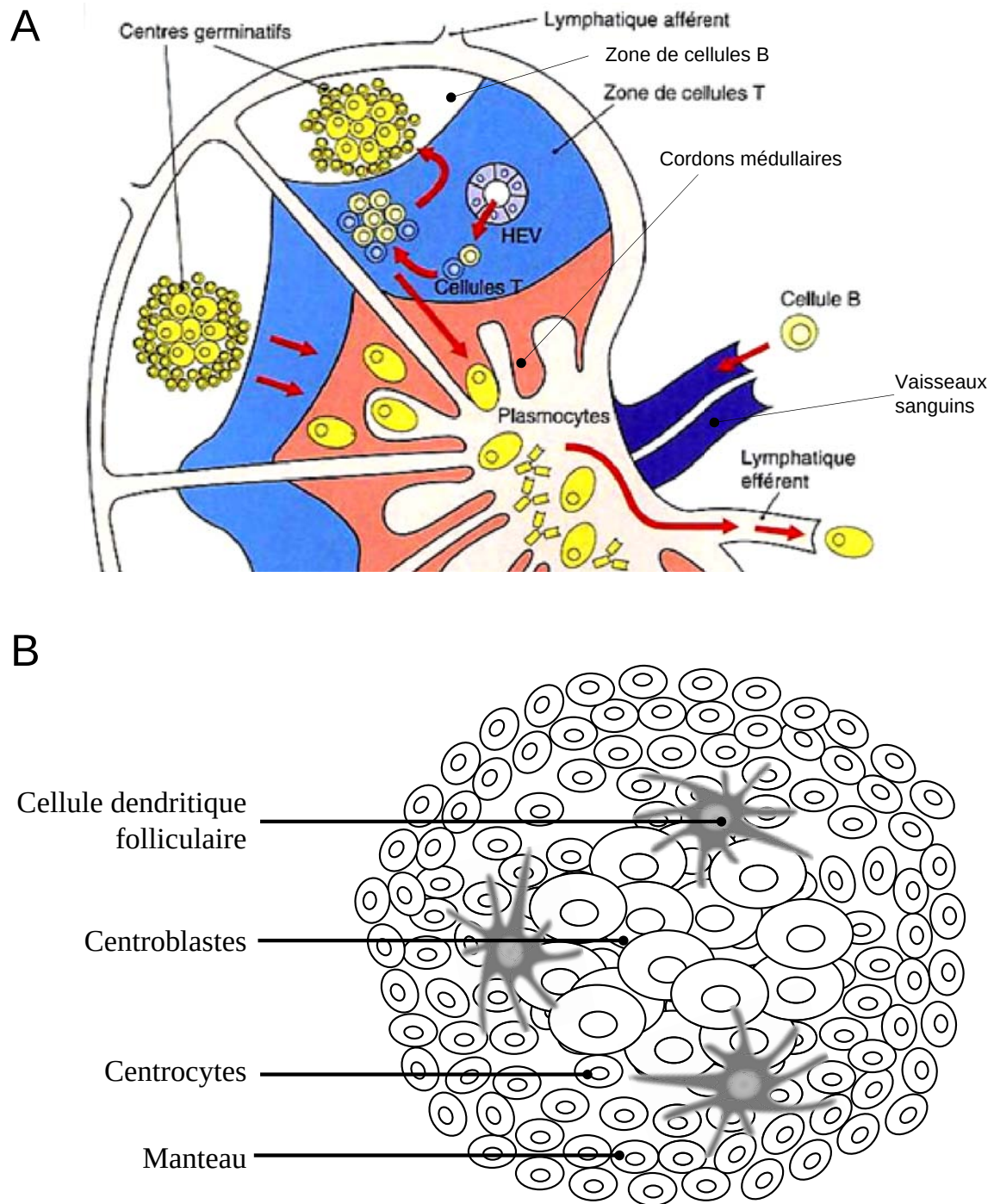


Figure 7: A) Schéma de l'activation des lymphocytes B dans une coupe transversale de ganglion lymphatique. Le lymphocyte B mature entre dans la zone des cellules T en traversant la paroi des veinules postcapillaires dites HEV (high endothelial veinule). L'antigène est fourni par les lymphatiques afférents qui drainent la lymphe des tissus. Le lymphocyte B rencontre l'antigène et est activé par les lymphocytes T helper. La cellule B entre alors en division et forme un foyer primaire. Si l'anticorps à la surface du lymphocyte B a une affinité suffisante, la cellule migre vers les cordons médullaires où elle se différencie en plasmocyte sécreteur d'anticorps. Si l'affinité est moins forte, le lymphocyte B entre dans la zone des cellules B et forme un centre germinatif pour augmenter l'affinité des anticorps envers l'antigène. **B)** Représentation schématique d'un centre germinatif. Les centroblastes sont des cellules B en division et activées par l'Ag. Les centrocytes sont des cellules B qui ont subi les hypermutations. Elles interagissent avec les cellules dendritiques folliculaires présentant l'antigène pour vérifier leur affinité avec ce dernier. Les cellules dendritiques sont moins nombreuses mais leurs prolongements cellulaires forment un réseau étendu dans tout le centre. Le manteau contient également des lymphocytes T helper qui ont activés les lymphocytes B.

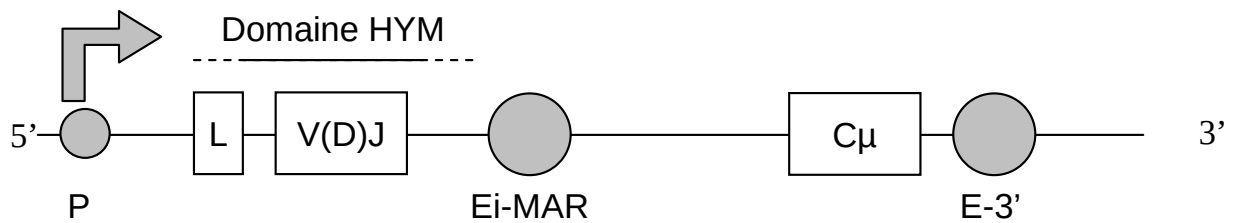


Figure 8: Représentation schématique d'un gène d'Ig réarrangé avec le domaine d'hypermutation (HYM). En gris, sont représentés les éléments transcriptionnels nécessaires aux mutations somatiques : P est le promoteur, Ei-MAR et E-3' sont des enhancer transcriptionnels.

consensus RGYW ne sont pas nécessairement mutés car les séquences avoisinant ce motif auraient également un rôle. Wright *et al* ont d'ailleurs démontré que pendant la transcription, le brin complémentaire ou l'ARN en cours de transcription formerait des épingles à cheveux dans lesquelles des motifs simple brin seraient exposés préférentiellement aux mutations somatiques [85-88]. Par ailleurs, les codons sérine AGC et AGT, qui font partie du consensus RGYW, sont des cibles fréquentes des mutations. Un biais dans la distribution de ces codons est d'ailleurs constaté au sein des gènes VH et VL. En effet, les codons sérine AGC et AGT sont plus fréquemment présents que les codons sérine TCN dans les régions CDR1 et 2 des gènes V. Ce biais provoque une augmentation de la fréquence des mutations dans ces régions [84] qui se traduit par une augmentation de la variabilité des domaines CDR1 et CDR2 (figure 9). Cette observation est valable aussi bien chez les mammifères que chez les poissons. L'évolution aurait donc favorisé l'usage de ces deux codons dans les domaines CDR ce qui souligne l'importance d'avoir des gènes V qui puissent être mutés.

Par ailleurs, les deux brins d'ADN peuvent être les cibles des mutations somatiques mais un biais est observé pour le brin codant [77, 89, 90]. En effet, les mutations sur les adénosines (A) sont toujours plus nombreuses au niveau du brin codant qu'au niveau du brin non-codant (table 2A et B). De plus, lors d'une stimulation antigénique, les guanosines (G) sont plus fréquemment mutées que les cytidines (C) sur le brin codant (table 2A). Mais cette dernière observation peut être due à la pression de sélection provoquée par la stimulation antigénique. De ce fait, la table 2B reflète certainement mieux le profil des mutations telles qu'elles ont été introduites par la machinerie d'hypermutation puisqu'un intron n'est pas soumis à cette pression de sélection. Enfin, les transitions ($A \rightarrow G$; $G \rightarrow A$; $C \rightarrow T$; $T \rightarrow C$) sont plus fréquentes (55% au total) que les transversions [77, 83].

III.2. La commutation de classe

Tout comme les mutations somatiques, la commutation de classe va avoir lieu dans les centres germinatifs. Cependant, le résultat de ce mécanisme est différent. Comme son nom l'indique, ce phénomène va consister en une commutation des régions constantes des chaînes lourdes pour passer d'une IgM transmembranaire à une autre immunoglobuline mieux adaptée pour la destruction de l'antigène.

Cette commutation est en fait une recombinaison entre des régions introniques de 1 à 12 kb de longueur, appelées régions « switch » (S), qui précèdent chaque gène CH, sauf le gène CH δ (figure 10). Les régions S contiennent des répétitions en tandem de petites séquences nucléiques spécifiques. Par exemple, la région S μ (en amont du gène C μ) contient une

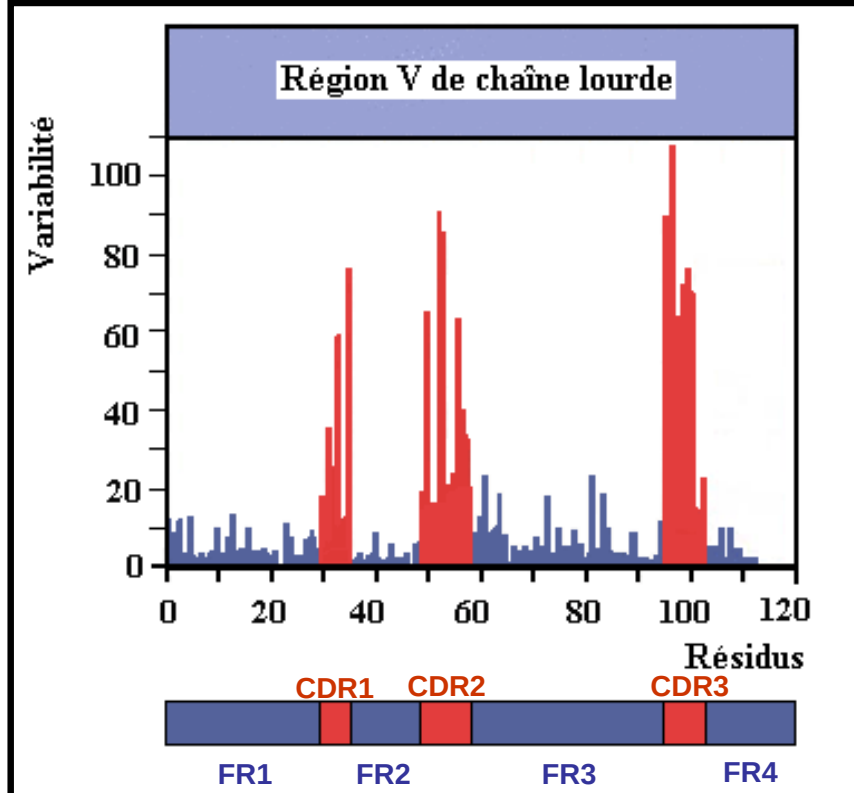


Figure 9: Hypervariabilité des régions CDR. Cet histogramme, obtenu en comparant un grand nombre de domaines variables de chaînes lourdes, montre la variabilité des différents acides aminés le long du domaine VH. La variabilité est le rapport entre le nombre d'acides aminés différents à une position donnée et la fréquence des acides aminés les plus communs à cette position. Les trois CDR sont les régions les plus variables du domaine VH.

Table 2: Profil des mutations typiquement observées sur le brin codant d'un gène d'Ig réarrangé de souris.

De	Vers				Total	Total
	A	T	C	G	brin codant	brin non-codant
(A) mutations sur une séquence sélectionnée par un antigène						
A	-	10.6 (1.2)	6.3 (0.9)	14.6 (0.7)	31.6 (1.7)	11.0 (1.3)
T	3.1 (0.6)	-	5.3 (1.1)	2.6 (0.6)	11.0 (1.3)	31.6 (1.7)
C	4.3 (0.8)	13.4 (1.3)	-	3.6 (0.7)	21.3 (1.3)	36.1 (2.5)
G	20.1 (1.9)	7.2 (1.4)	8.7 (0.7)	-	36.1 (2.5)	21.3 (1.3)
(B) mutations sur une séquence non-sélectionnée par un antigène						
A	-	9.9 (0.5)	7.3 (0.5)	16.5 (0.5)	33.7 (0.7)	18.0 (0.6)
T	5.4 (0.3)	-	9.0 (0.5)	3.6 (0.3)	18.0 (0.6)	33.7 (0.7)
C	3.7 (0.3)	15.0 (0.8)	-	5.9 (0.6)	24.6 (1.0)	24.4 (0.7)
G	14.4 (0.6)	4.2 (0.4)	6.5 (0.7)	-	24.4 (0.7)	24.6 (1.0)

Les valeurs sont des pourcentages moyens, et les erreurs standard sont indiquées entre parenthèses. (A) les profils ont été obtenus en relevant les mutations sur un gène VDJ de chaîne lourde sélectionné après une stimulation antigénique. Les moyennes sont issues de 12 études. (B) les profils ont été obtenus en relevant les mutations sur l'intron entre un gène VDJ de chaîne lourde et Ei-MAR dans les organes lymphoïdes secondaires de souris saines. Les moyennes sont issues de 20 études. Ce tableau est issu de Steele *et al* [77].

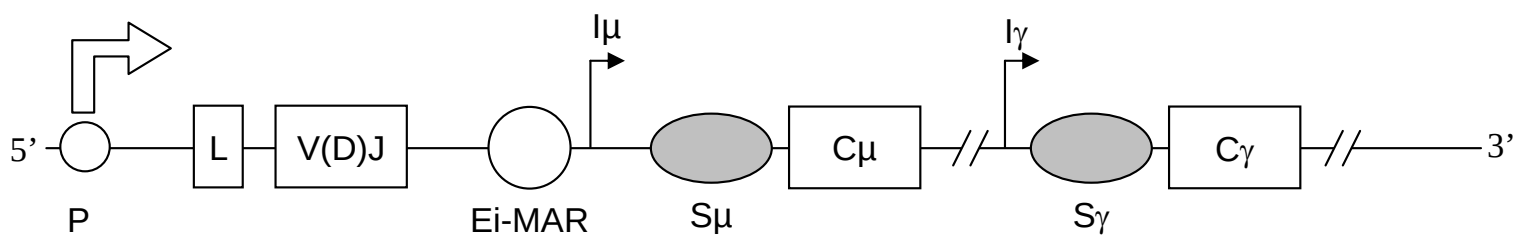


Figure 10: Représentation schématique d'un gène d'Ig réarrangé. En gris, sont représentés les éléments nécessaires à la commutation de classe : les régions S_μ et S_γ sont des régions « switch » qui permettent la commutation de classe. Chaque région S est précédée d'un promoteur transcriptionnel I. P est le promoteur transcriptionnel des chaînes lourdes, Ei-MAR est un enhancer transcriptionnel.

répétition en tandem (TRS μ), qui peut être représentée par la séquence consensus (GAGCT)₃GGGGT qui se répète environ 150 fois pour former un élément de 3 kb. Chaque région S a une répétition bien distincte mais chacune contient au moins quelques motifs GAGCT et GGGGT [91, 92]. Notons également que le motif GAGCT est une séquence RGYW. Des études sur les régions S ont montré qu'une lignée de souris déficiente pour les motifs TRS μ montrait seulement une diminution d'un facteur 2-3 du taux de commutation. Ceci démontre que, bien que ces répétitions soient nécessaires pour une commutation efficace, les autres éléments de la région S sont suffisantes pour induire cette recombinaison [93]. D'ailleurs Khamlichi *et al* ont montré que chez des souris avec une délétion plus importante dans l'intron JH-C μ , la perte de commutation était nettement plus prononcée [94]. De plus, des lignées de souris qui possèdent des régions S γ 1 de tailles variées présentent un pourcentage de commutation de classe corrélée avec la longueur de leur région S γ 1 [95].

A nouveau, la recombinaison CSR est étroitement liée à la transcription. En effet chaque région S est précédée par un promoteur I et des études ont montré que l'intégrité de ces promoteurs et la transcription étaient indispensables pour une commutation de classe efficace [96-99]. En effet, chez les mammifères, les régions S sont riches en résidus G au niveau des brins non codants ce qui va permettre, durant la transcription, la formation d'une structure stable entre le brin codant et l'ARN, appelée « boucle R ». Ces boucles permettraient ainsi aux régions S d'être la cible de la machinerie de commutation [92, 100]. Cette machinerie doit d'ailleurs induire des cassures double-brin au niveau des régions S afin de permettre la commutation de classe [77, 101, 102].

La transcription des gènes CH cibles est aussi induite par différentes cytokines et certains mitogènes [103]. Par exemple, chez la souris, une stimulation de lymphocytes B spléniques par du lipopolysaccharide (LPS) avec de l'interleukine 4 (IL-4) induira une commutation vers la région C γ 1, permettant ainsi l'expression d'IgG1. Par contre, une stimulation des mêmes cellules par du LPS et de l'interferon γ induira plutôt une commutation en IgG2 [93].

III.3. Mécanisme de la maturation des anticorps

III.3.1. Points communs entre les hypermutations somatiques et la commutation de classe

Bien que le résultat des hypermutations somatiques et de la commutation de classe soit différent, ces 2 mécanismes présentent tout de même plusieurs points communs.

En effet tous deux :

- ont lieu dans les centres germinatifs après reconnaissance de l'antigène,
- dépendent de la transcription,
- font appel aux motifs RGYW,
- nécessitent la formation structures secondaires dans l'ARN et/ou l'ADN,
- requièrent la protéine AID, comme nous allons le voir ci-dessous.

III.3.2. La protéine AID

De nombreuses études ont démontré que les hypermutations somatiques et la commutation de classe dépendent d'une même protéine qui est l'activation induced cytidine deaminase (AID). Cette protéine a été identifiée chez la souris par Muramatsu *et al* qui a montré qu'AID est exprimée exclusivement dans les lymphocytes B des centres germinatifs et dans des lymphocytes B stimulés par du LPS *in vitro* [104]. De plus, une mutation particulière du gène AID chez l'homme est responsable du syndrome HIGM2 qui se traduit par un défaut de la commutation de classe, une déficience des mutations somatiques et des centres germinatifs anormaux [105].

La protéine AID est constituée de 198 acides aminés chez les mammifères. Les premières études ont révélé qu'AID possède un motif cytidine désaminase [77, 106-108] et peut donc désaminer les cytidines (C) les modifiant ainsi en uracile (U). AID appartient donc à la grande famille des cytidines désaminases et d'un point de vu phylogénétique se rapproche des « RNA editing désaminases », comme APOBEC-1, mais forme une sous famille bien distincte [104, 109]. AID cible préférentiellement les motifs RGYW en cours de transcription [90, 107, 110] et peut cibler les deux brins d'ADN [111].

Plusieurs études ont montré que l'expression d'AID est suffisante pour induire des mutations et provoquer la commutation de classe dans des lymphocytes B ou dans d'autres cellules comme des fibroblastes [112-114]. Il est important de noter qu'une surexpression ou une expression ubiquitaire d'AID dans des souris transgéniques ne provoque cependant pas une augmentation de la commutation de classe ni des hypermutations [115-117]. Par contre, plusieurs études ont montré qu'une surexpression d'AID dans d'autres cellules est corrélée à des cancers du poumon [118], du foie [119] ou des lymphomes de type T [118]. Ces observations démontrent donc que l'expression d'AID est activement régulée de manière spécifique dans les lymphocytes B. J'aborderai donc les mécanismes régulant son expression avant de voir plus en détail son mécanisme d'action.

III.3.3. La régulation d'AID

III.3.3.1. Régulation transcriptionnelle

Plusieurs études ont montré que l'expression d'AID est régulée par de nombreux facteurs de transcription tels qu'E2A [120], Pax5 [121], NFκB, STAT6 [122] et HoxC4 [123]. La figure 11 cartographie les sites consensus de fixation à des facteurs de transcription identifiés à ce jour au niveau du promoteur d'AID de la souris ou de l'homme, cependant certains de ces sites n'ont pas encore été vérifiés comme étant fonctionnels.

En plus de son rôle dans la recombinaison V(D)J, Pax 5 est un facteur de transcription important pour l'expression d'AID. En effet, Gonda *et al* ont observé qu'une région de 400 pb en amont du promoteur AID contient un site consensus de fixation à Pax5 et E2A [121]. Cette région est très homologue entre l'homme et la souris. Ils ont montré que Pax5 est recruté sur le locus AID dans des lymphocytes B activés *in vitro* par du LPS et de l'IL-4 et qu'une surexpression de Pax5 mais pas d'E2A induit la transcription d'AID dans des lignées cellulaires pro-B. Par ailleurs, ils ont démontré qu'une surexpression d'Id-2, un inhibiteur de Pax5 et E2A, réduit le nombre de transcrits AID *in vitro* et que des cellules spléniques Id-2^{-/-} surexpriment AID. Cette dernière observation laisse supposer l'existence d'une balance Pax5/Id2 importante pour réguler l'expression d'AID (figure 12). Bien qu'une surexpression d'E2A n'induisse pas la transcription d'AID, la fixation de ce facteur au promoteur est très importante. En effet, Hauser *et al* [120] ont observé qu'une diminution du nombre de transcrits E2A provoque un arrêt de l'expression génique d'AID. Par ailleurs, ces auteurs ont montré qu'une stimulation de lymphocytes B spléniques murins par du LPS et de l'IL4 induit une augmentation d'un facteur 100 des transcrits AID. Par contre, si le lymphocyte B perçoit un signal indiquant une bonne affinité de l'anticorps, alors la transcription d'AID sera arrêtée. Cet arrêt est dû à une fixation de la calmoduline chargée en calcium avec la protéine E2A qui ne peut alors plus se lier au niveau de l'enhancer transcriptionnel d'AID pour induire son expression (figure 12).

De leur côté, Dedeoglu *et al* [122] ont montré qu'une stimulation de lymphocytes B par de l'IL-4 et un anticorps anti-CD40 induit l'expression génique d'AID. Plus précisément, ils ont démontré que L'IL-4 induit la liaison de STAT6 en 5' du promoteur d'AID alors que la liaison de CD40 provoque la fixation de NFκB sur deux sites dans la même région promotrice. De plus, chez des souris STAT6^{-/-}, AID n'est plus surexprimé en présence d'IL-4. De même, chez des souris p50^{-/-}, c'est-à-dire déficientes pour une des sous-unités de NFκB, la

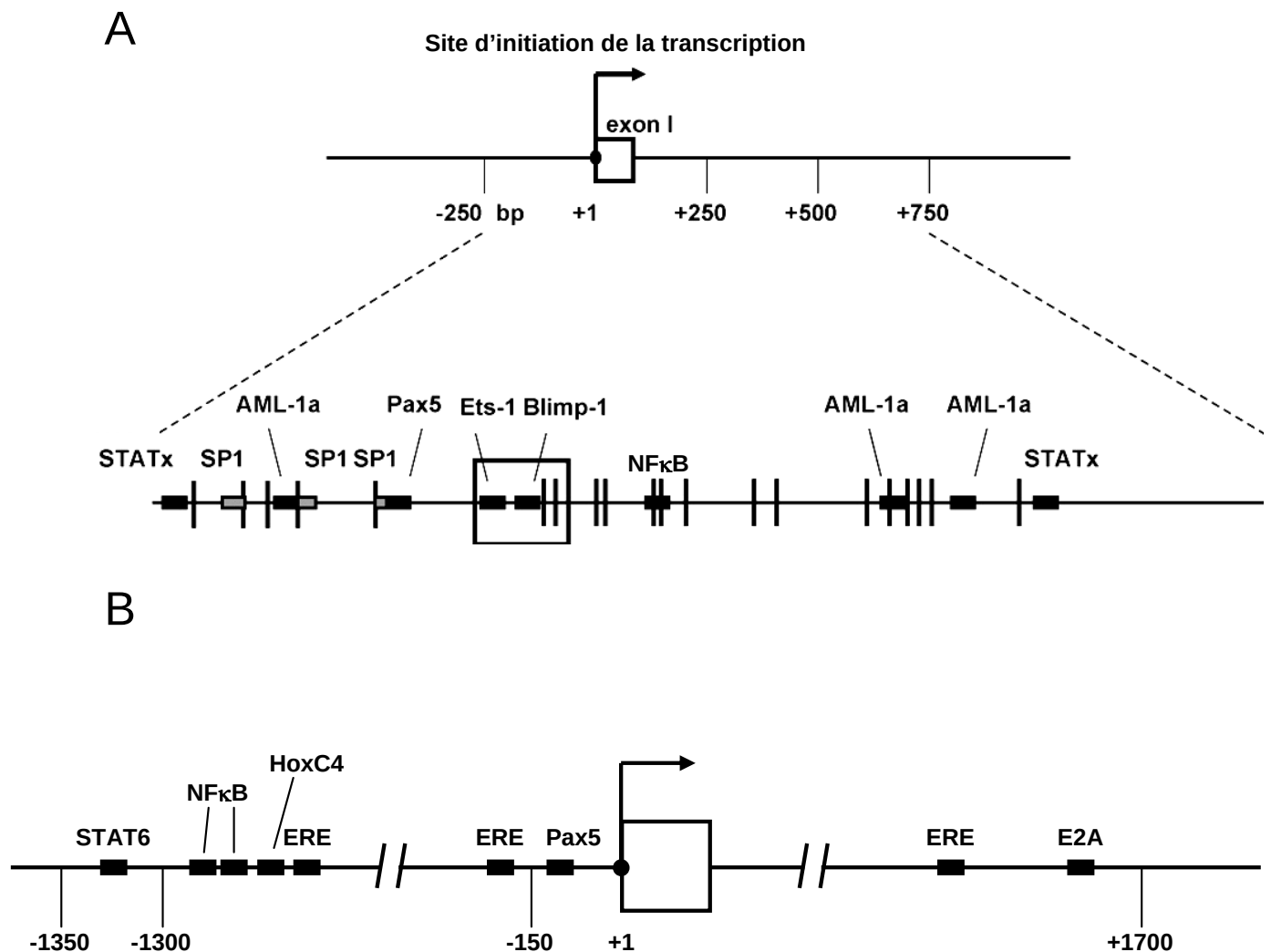


Figure 11: Représentations schématiques de la région encadrant le promoteur d'AID chez la souris (**A**) et chez l'homme (**B**). Le rectangle blanc représente l'exon 1 du gène AID. Les zones épaissies représentent les différents sites consensus de fixation de facteurs de transcription, avec le facteur correspondant indiqué au-dessus. Les traits verticaux indiquent les différents îlots CpG présents le long du promoteur. Les traits obliques espacés représentent des raccourcissements de séquence (adapté des travaux de Fujimura *et al* [126]). Notons la présence d'un site consensus Blimp-1, un répresseur transcriptionnel exprimé lors de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. Il est donc probable que ce facteur réprime la transcription d'AID une fois la maturation achevée.

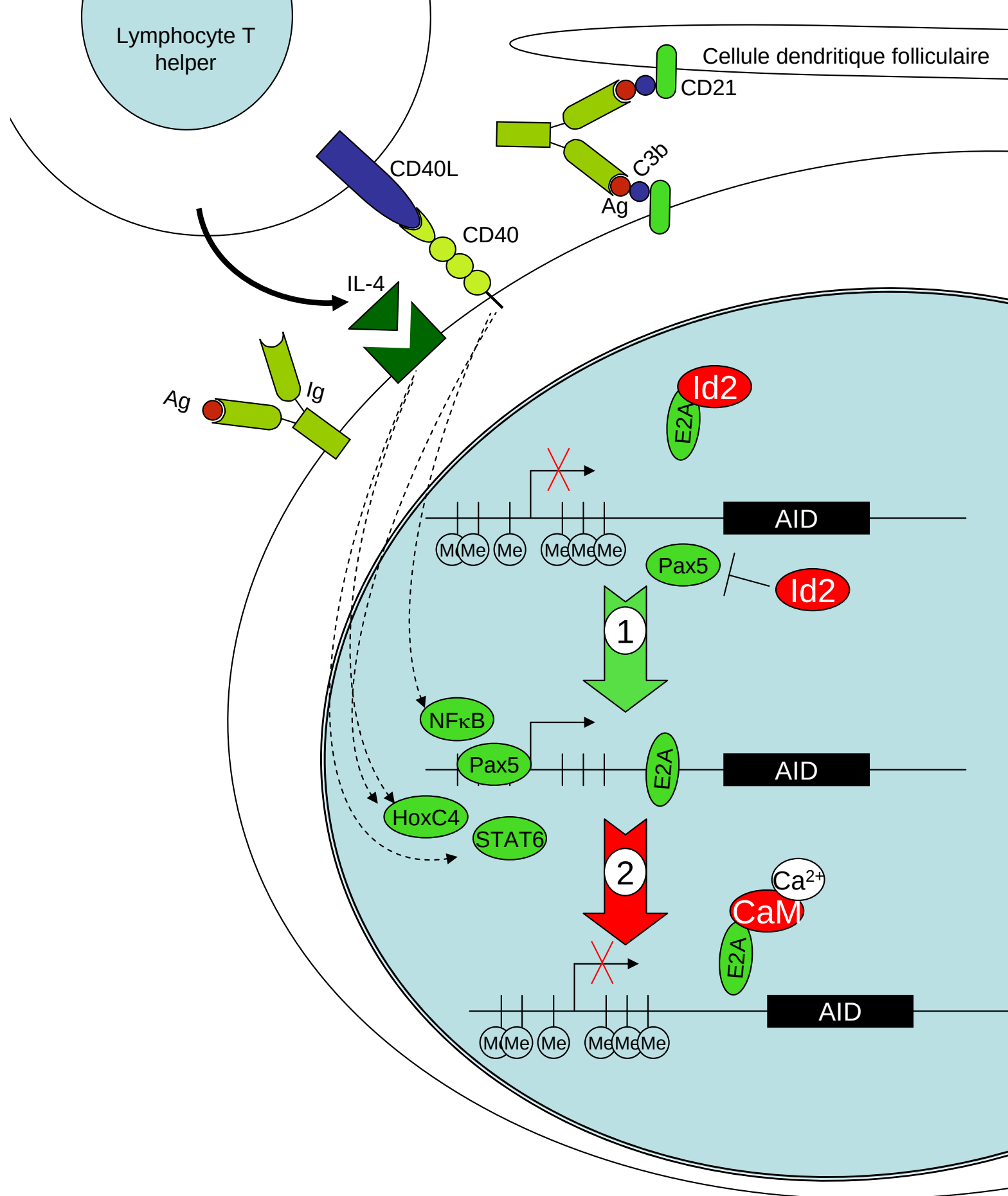


Figure 12: Schéma des différents signaux activant les lymphocytes B et induisant l'expression d'AID. Avant l'activation, le promoteur d'AID est hyperméthylé (Me) et la fixation des facteurs de transcription Pax5 et E2A est inhibée par Id2. 1) Après activation, Pax5 et E2A vont se retrouver en excès par rapport à Id2 et vont pouvoir se fixer sur le promoteur d'AID avec d'autres facteurs de transcription pour induire la transcription d'AID. 2) Une fois la maturation de l'affinité achevée, le promoteur est à nouveau hyperméthylé et E2A fixe la calmoduline (CaM) chargée en calcium.

liaison de CD40 n'induit plus l'expression d'AID. *In vivo*, ce sont ces signaux qui sont induits par les lymphocytes T Helper (figure 7A et 12) lors de l'activation des lymphocytes B. D'autres cytokines peuvent également induire la transcription d'AID telle que l'IL-21. De manière intéressante, cette cytokine n'induit que la commutation de classe et pas les mutations somatiques [124].

Plus récemment, Park *et al* [123] ont montré que HoxC4 se fixe directement sur le promoteur d'AID. En effet, une stimulation de lymphocytes B par du LPS et de l'IL-4 ou par CD154 (un ligand de CD40) induit une expression de HoxC4 dans les lymphocytes B des centres germinatifs. De plus, une déficience en HoxC4 provoque une diminution du nombre de transcrits AID. Le même résultat est observé en supprimant le site de fixation de ce facteur dans le promoteur d'AID (figure 12).

Il est intéressant de noter que la perte d'un de ces facteurs de transcription provoque systématiquement une diminution importante de la transcription d'AID. Il est donc possible que tous ces facteurs agissent en synergie au niveau du promoteur.

En plus de sélectionner les lymphocytes B avec un anticorps de meilleure affinité, les cellules dendritiques folliculaires peuvent aussi induire la transcription d'AID [125]. Cette activation de la transcription est dépendante de l'interaction de complexes immuns (antigène + anticorps +/- complément) avec le récepteur au complément CD21 (appelé aussi CR3d ou CR2) présent à la surface des lymphocytes B et des cellules dendritiques (figure 12).

Des modifications épigénétiques ont également été notées au niveau de la région promotrice d'AID. Fujimura *et al* [126] ont en effet remarqué que le promoteur d'AID est entouré de 20 îlots CpG (5 dans la région promotrice, 2 dans l'exon 1 et 13 dans l'intron) (figure 11A). Ils ont observé que durant le développement des lymphocytes B, ces 20 îlots sont méthylés alors que dans des cellules de centres germinatifs, ils ne le sont plus. Dans les plasmocytes, ces îlots sont à nouveau méthylés (figure 12). De plus, le nombre de régions méthylées est inversement proportionnel au taux de transcrits AID de ces cellules. Par ailleurs, en stimulant des lymphocytes B par du LPS et de l'IL-4, ces îlots CpG sont progressivement déméthylés sous 24 heures. Ces observations montrent que la méthylation du promoteur d'AID est un facteur important dans sa régulation transcriptionnelle.

Enfin, toutes les études de northern blotting réalisées sur AID ont révélé deux transcrits de tailles différentes (1.2 et 2.4 kb chez la souris et le xénope) en quantités équivalentes [104, 122, 127]. Muramatsu *et al* [128] ont montré que le transcrit le plus long présente 2 sites de polyadénylation dans sa région 3' non traduite (3'UTR) signifiant qu'il s'agirait de différentes formes polyadénylées. Chez l'homme, la séquence complète de l'ARNm d'AID a également

révélé la présence d'au moins 3 sites consensus de polyadénylation dans la région 3'UTR. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a décrit un mode de régulation corrélé avec ces différentes formes polyadénylées.

III.3.3.2. Régulation post-transcriptionnelle

Le fait que la transcription d'AID puisse être induite par de nombreux facteurs, dont certains qui ne sont pas spécifiques des lymphocytes B, impose aux cellules de posséder d'autres barrières de régulation afin d'éviter une expression aberrante de ce gène. Parmi ces voies, des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle d'AID ont été décrits récemment.

Le gène AID est constitué de 5 exons chez les mammifères. Par épissage alternatif, certains de ces exons peuvent être perdus [129]. Ce phénomène a d'abord été observé dans des cellules B malignes mais plus récemment, Wu *et al* [129] ont démontré que ce mécanisme a également lieu dans des lymphocytes B normaux (ceux des centres germinatifs et les lymphocytes B mémoire). Ils ont observé que chaque lymphocyte B exprime une seule forme épissée d'AID. La forme complète de l'ARNm AID est la plus abondante dans les organes lymphoïdes secondaires (table 3). Les formes épissées sont plus rares et généralement présentes dans les cellules mémoires. Ceci suggère un mécanisme permettant de réguler l'expression d'AID. Les auteurs ont également montré que les différentes formes épissées peuvent augmenter les hypermutations ou inactiver la commutation de classe. De plus, ils ont observé que la proportion des différentes formes épissées change dans des cellules leucémiques. Par exemple, la forme épissée AID- $\Delta E4$ qui augmente le taux de mutations peut représenter jusqu'à 40% des transcrits AID alors que dans des conditions normales elle ne représente pas plus de 10%. Ces études montrent donc que l'épissage d'AID est rigoureusement régulé.

D'autres équipes ont démontré que l'ARNm d'AID est régulé par les microRNA (miRNA) qui sont une classe d'ARN non-codants de 20-23pb incorporés dans des complexes protéiques. L'ensemble va se fixer sur une séquence complémentaire située en général dans la région 3'UTR d'un ARNm pour réguler son expression. Cette régulation peut se faire par divers mécanismes tels que la dégradation, l'inhibition de la traduction, ou encore le transport de l'ARNm. De Yébenes *et al* [130] ont ainsi démontré qu'AID est régulé par le miRNA miR-181b. La région 3'UTR de l'ARNm d'AID contient en effet un site fonctionnel de fixation de ce miRNA. De plus, une surexpression de miR-181b provoque une diminution du nombre d'ARNm et de la protéine AID ainsi que de la commutation de classe. Par ailleurs, miR-181b est surexprimé dans des lymphocytes B naïfs et diminue fortement après une

Table 3: Description des différentes formes épissées d’AID.

Nom	Représentation schématique	Fréquence	CSR	SHM
AID		77%	++	++
AID-ΔE4a		7%	-	+++++
AID-ΔE4		10%	-	+++
AID-ΔE3E4		3%	-	-
AID-ivs3		3%	N-P	N-P

Le symbole hexagonal S représente un codon stop. Les zones plus claires ne sont pas traduites. Pour AID-ivs3, l’intron entre l’exon 3 et 4 est maintenu. CSR est le diminutif de la commutation de classe et SHM celui des hypermutations somatiques. N-P signifie que la forme est non-productive. La fréquence est la proportion observée dans les amygdales d’un individu sain. Adapté des résultats de Wu *et al* [129].

stimulation des cellules avec du LPS et de l'IL-4. Son expression ré-augmente ensuite progressivement. Ce profil d'expression est donc opposé à celui d'AID laissant supposer que miR-181b empêche la transcription de ce gène en dehors de la maturation de l'affinité. Deux autres équipes ont démontré qu'AID est aussi régulé par le miRNA miR-155 [116, 131]. Contrairement à miR-181b, miR-155 est immédiatement surexprimé dans des lymphocytes activés par du LPS et de l'IL-4. De ce fait, ces 2 miRNA auraient des fonctions complémentaires (figure 13). MiR-155 se fixe sur une séquence consensus dans la région 3'UTR de l'ARNm d'AID et provoque sa dégradation. Chez la souris, une mutation du site consensus de fixation de miR-155 provoque d'ailleurs le maintien des ARNm AID dans des cellules B matures ayant quitté les centres germinatifs. Cependant, le taux de mutations somatiques n'est pas plus élevé et l'affinité des anticorps est moins bonne. De plus, les auteurs ont observé un nombre anormal de mutations au niveau de l'oncogène Bcl6 et une augmentation des translocations Myc-IgH caractéristiques du lymphome de Burkitt. La régulation post-transcriptionnelle est donc une étape clé de la régulation d'AID non-seulement indispensable pour une bonne maturation de l'affinité des anticorps mais également pour empêcher une expression aberrante de la protéine.

III.3.3.3. Régulation post-traductionnelle

Une fois traduite, AID est activement régulée par différents mécanismes. Ainsi, plusieurs travaux ont montré que le transport nucléo-cytoplasmique d'AID a un rôle important. En effet, bien que le rôle d'AID soit d'induire des mutations sur l'ADN, sa localisation est principalement cytoplasmique (90%) grâce à l'exportine CRM-1 [132]. En effet, un traitement à la leptomycine B (LMB), un inhibiteur de cette exportine, provoque une localisation majoritairement nucléaire [132-134]. CRM-1 génère donc un export nucléaire massif d'AID (figure 13). Ce dernier se fait *via* la reconnaissance d'un signal d'export nucléaire (NES) en C-terminal d'AID. D'ailleurs, une mutation saut de phase en amont des 10 derniers acides aminés d'AID (figure 14) ou la délétion du motif NES bloque l'export d'AID. De plus, la localisation nucléaire d'AID dépend elle aussi d'un motif mais en N-terminal qui est appelé signal de localisation nucléaire (NLS) (figure 14). Sans ce signal, AID est incapable d'entrer dans le noyau [134]. Ces 2 motifs sont cruciaux pour le bon fonctionnement d'AID car sans le motif NLS il y a perte complète des mutations somatiques et de la commutation de classe, prouvant ainsi qu'AID agit bien dans le noyau. Par contre, la perte du motif NES augmente la fréquence des mutations somatiques, ce qui s'explique par la présence excessive d'AID dans le noyau, mais provoque une perte de la commutation de

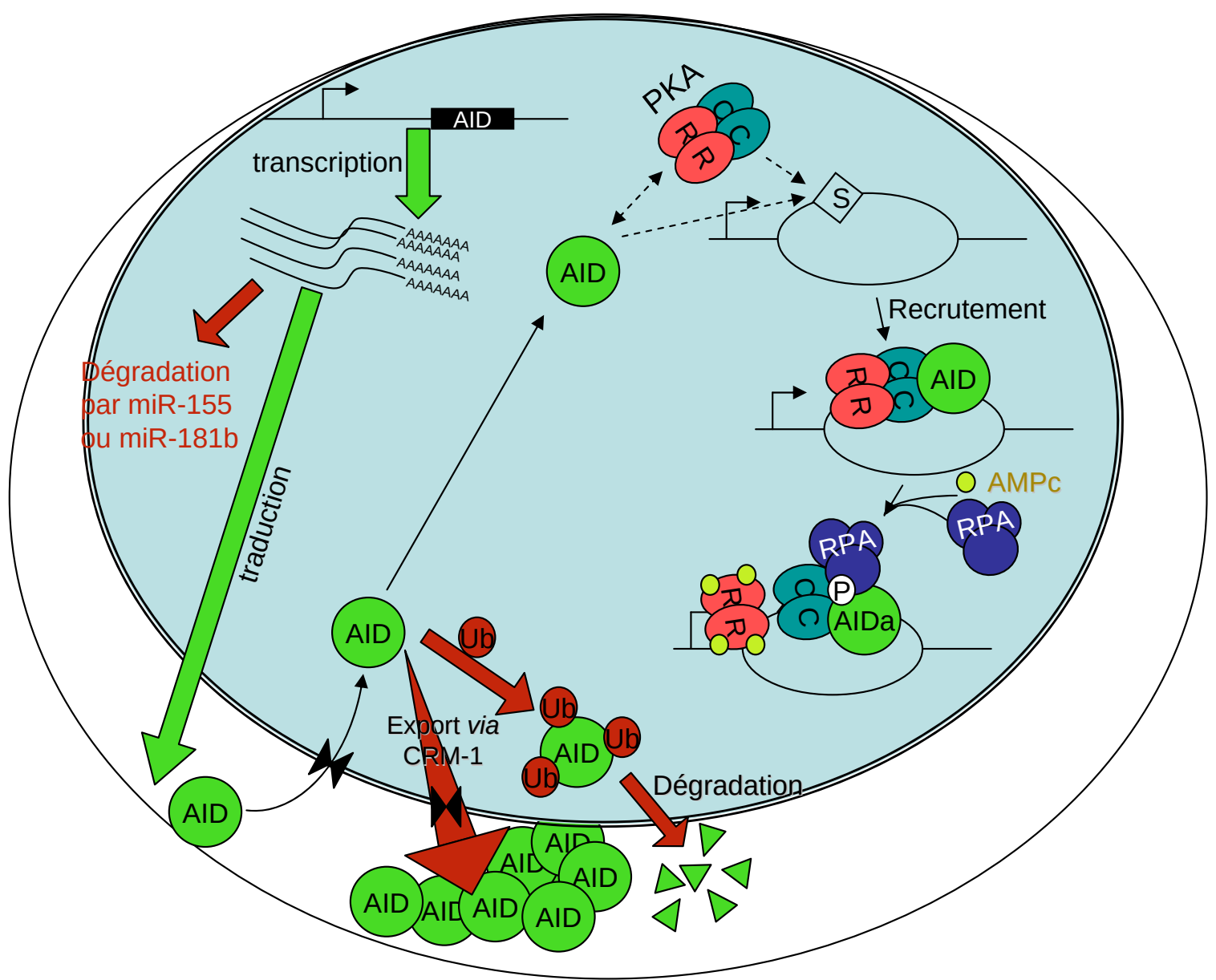


Figure 13: Représentation schématique des différentes régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles d'AID. Après avoir été transcrit, l'ARNm est dégradé par des miRNA (miR-155 dans les lymphocytes B activés et miR-181b dans les lymphocytes B naïfs ou matures). Une fois traduit, AID entre dans le noyau grâce à son NLS (signal de localisation nucléaire) mais est rapidement expulsé par CRM-1. Une autre partie est ubiquitiné (Ub) et dégradée par le protéasome. Le restant d'AID nucléaire va se fixer sur sa cible en cours de transcription (ici une région S) soit sous forme de complexe avec la PKA soit indépendamment. Les sous-unités régulatrices (R) vont empêcher la phosphorylation d'AID, la maintenant ainsi inactive jusqu'à une augmentation de la quantité d'AMPc. Les sous-unités catalytiques (C) vont alors être libérées et vont phosphoryler (P) AID. AID est alors actif (AIDa) et peut recruter RPA ce qui va induire la cascade de réactions permettant la commutation de classe ou les hypermutations somatiques.

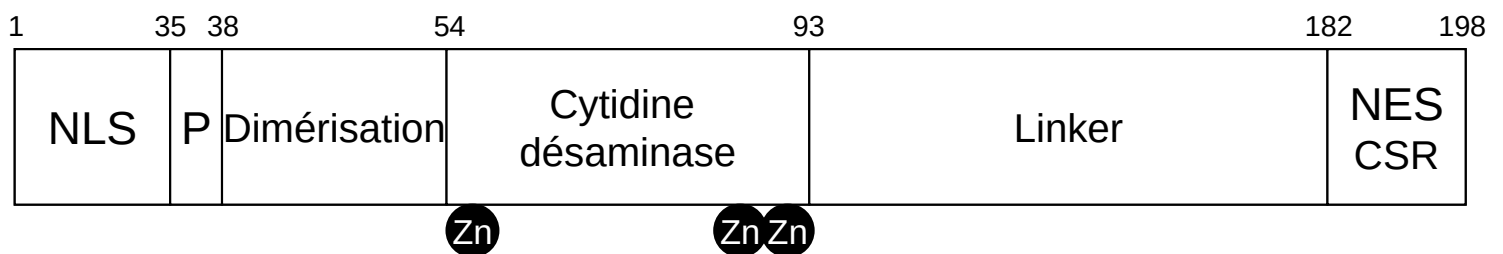


Figure 14: Les différents domaines de la protéine AID. Le nombre d'acides-aminés est indiqué au dessus. NLS est le signal de localisation nucléaire, P est le site de phosphorylation et le NES est le signal d'export nucléaire. Le motif cytidine désaminase possède 3 sites de liaison au Zn^{2+} indispensables pour son activité. La région linker n'a pas de fonction définie, cependant certaines mutations dans ce domaine ont montré une perte de l'activité d'AID.

classe [132, 134-136]. Cette dernière observation montre que le motif NES a également un rôle dans la régulation de la commutation de classe. Par ailleurs, Doi *et al* [136] ont montré que la commutation de classe est possible si la LMB est ajoutée en même temps ou une heure après avoir induit l'expression d'AID. Ceci signifie que l'export nucléaire d'AID fait partie d'une des étapes de la commutation de classe. Geisberger *et al* [135] ont d'ailleurs récemment démontré que l'efficacité de l'export nucléaire est corrélée à l'activité de commutation et que la liaison à l'exportine est importante pour la stabilité d'AID durant la commutation de classe. Ces études démontrent donc que la cascade de réactions suivant l'action d'AID est certainement différente entre la commutation de classe et les mutations somatiques.

De plus, Aoufouchi *et al* [133] ont montré que la demi-vie nucléaire de la protéine AID est réduite. Cette déstabilisation est corrélée à une polyubiquitination de la protéine (révélée en présence d'inhibiteur du protéasome). Cette ubiquitination ne semble cependant pas toucher une lysine en particulier car la substitution de toutes les lysines par des arginines a un effet stabilisateur de la protéine. AID serait donc une cible du protéasome (figure 13).

Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré qu'AID interagit physiquement avec la protéine kinase A dépendante de l'AMPc (PKA) et est phosphorylée par cette dernière [100, 137-140]. La PKA est une protéine composée de 4 sous-unités : 2 sous-unités régulatrices et 2 sous-unités catalytiques. Lorsque la concentration en AMPc intracellulaire augmente, les sous-unités régulatrices fixent l'AMPc et libèrent les sous-unités catalytiques qui peuvent alors phosphoryler leurs cibles c'est-à-dire la sérine (S) ou la thréonine (T) de la séquence consensus RRXS/T. AID possède 2 sites consensus de ce type : T27 et S38. Très récemment, Cheng *et al* [139] ont montré que des souris mutées pour le site S38 présentent une sévère diminution de la commutation de classe et de la fréquence des mutations somatiques. Par ailleurs, la forme phosphorylée d'AID se retrouve principalement dans le noyau en contact avec l'ADN [141]. Vuong *et al* [140] ont également démontré que la PKA est recrutée au niveau des régions Sy1 et S μ après une stimulation avec du LPS et de l'IL-4 dans des cellules AID^{-/-}, ce qui suggère que la PKA peut se fixer au niveau des régions cibles indépendamment d'AID. Cependant, il reste à savoir si AID et la PKA sont recrutées séparément sur l'ADN ou si la PKA va transporter AID sur sa cible. La phosphorylation d'AID est donc une étape clé dans l'activation de cette protéine (figure 13). Plusieurs études ont montré que cette phosphorylation est en fait nécessaire pour permettre l'interaction d'AID avec la protéine ubiquitaire RPA (replication protein A) [110, 140, 142]. Bien que pour l'instant le rôle exact de RPA ne soit pas connu, sans cette interaction, l'activité d'AID est fortement compromise.

Enfin, la possibilité qu'AID doive se dimériser pour être active est actuellement discutée. Certains travaux ont en effet montré par microscopie à force atomique qu'AID interagit avec l'ADN simple brin sous forme de monomère [143] mais ces travaux ont été contredits par Bhagwat *et al* dans une lettre à l'éditeur [144] qui soutient que les tailles observées sont trop importantes par rapport à la petite taille d'AID (198 acides aminés). Cette critique est renforcée par les travaux de Prochnow *et al* [145] qui ont montré qu'une mutation dans le site potentiel de dimérisation provoque une diminution de l'activité désaminase d'AID sur l'ADN simple brin. Shivarov *et al* ont fait la même constatation mais leurs travaux ont montré que l'impact n'est pas le même sur les mutations somatiques ou la commutation de classe [146].

Quoi qu'il en soit, l'ensemble des mécanismes de régulations post-traductionnelles décrits ci-dessus ont permis de mettre en évidence différents domaines indispensables pour le fonctionnement de cette protéine (figure 14).

III.3.4. Autres facteurs impliqués dans les mécanismes d'hypermutation et de commutation de classe

Bien qu'AID soit suffisant pour induire la commutation de classe et les mutations somatiques, son action ne suffit pas à expliquer à elle seule la mutagenèse des gènes des immunoglobulines, et ceci pour deux raisons. La première est que les mutations observées ne se réduisent pas uniquement aux bases C mais apparaissent également sur les autres bases. La seconde est que l'uracile est une lésion assez banale dans l'ADN, produite soit par désamination métabolique des cytosines (quelques centaines par jour dans le génome humain), soit par incorporation incorrecte d'uracile à la place de la thymidine lors de la réplication de l'ADN (quelques milliers). La cellule eucaryote possède donc de nombreux systèmes de réparation dédiés à ces erreurs dont certains éléments semblent être impliqués dans les mécanismes de la maturation de l'affinité.

Nous pouvons citer l'uracile glycosylase (UNG), qui intervient dans les mécanismes de réparation par excision de base (BER). Rada *et al* [147] ont en effet mis en évidence que les mutations touchant les adénosines et les thymidines sont beaucoup moins fréquentes et que la commutation de classe est diminuée chez des souris KO pour ce gène. Plus récemment, Begum *et al* [148] ont montré qu'un mutant d'UNG ayant perdu son activité enzymatique est capable de restaurer la commutation de classe dans des cellules B UNG^{-/-}. Par contre, le domaine N-terminal d'UNG est indispensable pour la commutation de classe. De ce fait, UNG servirait plutôt de plate-forme à d'autres enzymes. Les travaux de Rada *et al* [147] ont

également montré que quand des souris sont KO pour MSH2, un élément du complexe MutS α (MSH2+MSH6) intervenant dans le système de réparation des mésappariements (MMR), elles présentent le même profil de mutations que les souris UNG^{-/-}. Des souris KO pour l'exonucléase 1 (Exo1), une exonucléase 5'→3' qui agit de concert avec MutS α , présentent également le même profil [149]. De plus, des souris doubles KO pour UNG et MSH2 présentent une absence quasi-totale de mutations sur les A et T et une perte de la commutation de classe [147]. Cette absence de mutation sur les A et T a également été observée chez un double KO MSH2-pol η (polymérase eta) [150]. Cette dernière est une polymérase translésionnelle, c'est-à-dire qu'elle participe au franchissement des lésions de l'ADN bloquant la progression de la fourche de réplication. Les mutations sur les A et T seraient donc générées principalement par cette polymérase en relation avec le complexe MutS α [89]. La polymérase η est d'autant plus un bon candidat qu'elle est connue pour être une polymérase générant des erreurs sur les paires A:T *in vitro* [77].

D'autre part, des souris KO pour le gène Rev1, une autre polymérase translésionnelle, ont montré une diminution des mutations sur les C:G [151]. Rev1 serait donc le facteur responsable de ces mutations.

Il est cependant important de noter que la perte d'un de ces facteurs ne modifie pas ou peu la fréquence des mutations, c'est uniquement un biais dans la distribution des mutations qui est observé [77, 147, 150, 151]. Cette constatation suggère donc que ces deux polymérases agissent de manière complémentaire. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que les travaux d'Arakawa *et al* [152] ont montré que si l'activation par ubiquitination de la protéine PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) est inhibée, la fréquence des mutations somatiques est alors diminuée. Cette protéine, déjà connue pour être un cofacteur des polymérases translésionnelles, est donc importante dans la mise en place des 2 polymérases citées ci-dessus. De plus, très récemment, Schanz *et al* [153] ont observé que le système MMR est réfractaire à un simple mésappariement U:G. Par contre, la présence d'un site abasique en 5' ou en 3' d'un de ces mésappariements permet d'initier le mécanisme MMR.

III.3.5. Modèles possibles

III.3.5.1. Modèle de Schanz *et al*

En se basant sur les différentes observations citées ci-dessus, Schanz *et al* [153] ont proposé un modèle du mécanisme des hypermutations et de la commutation de classe (figure 15). Ce modèle part du principe qu'AID génère plusieurs mésappariements U:G dans les

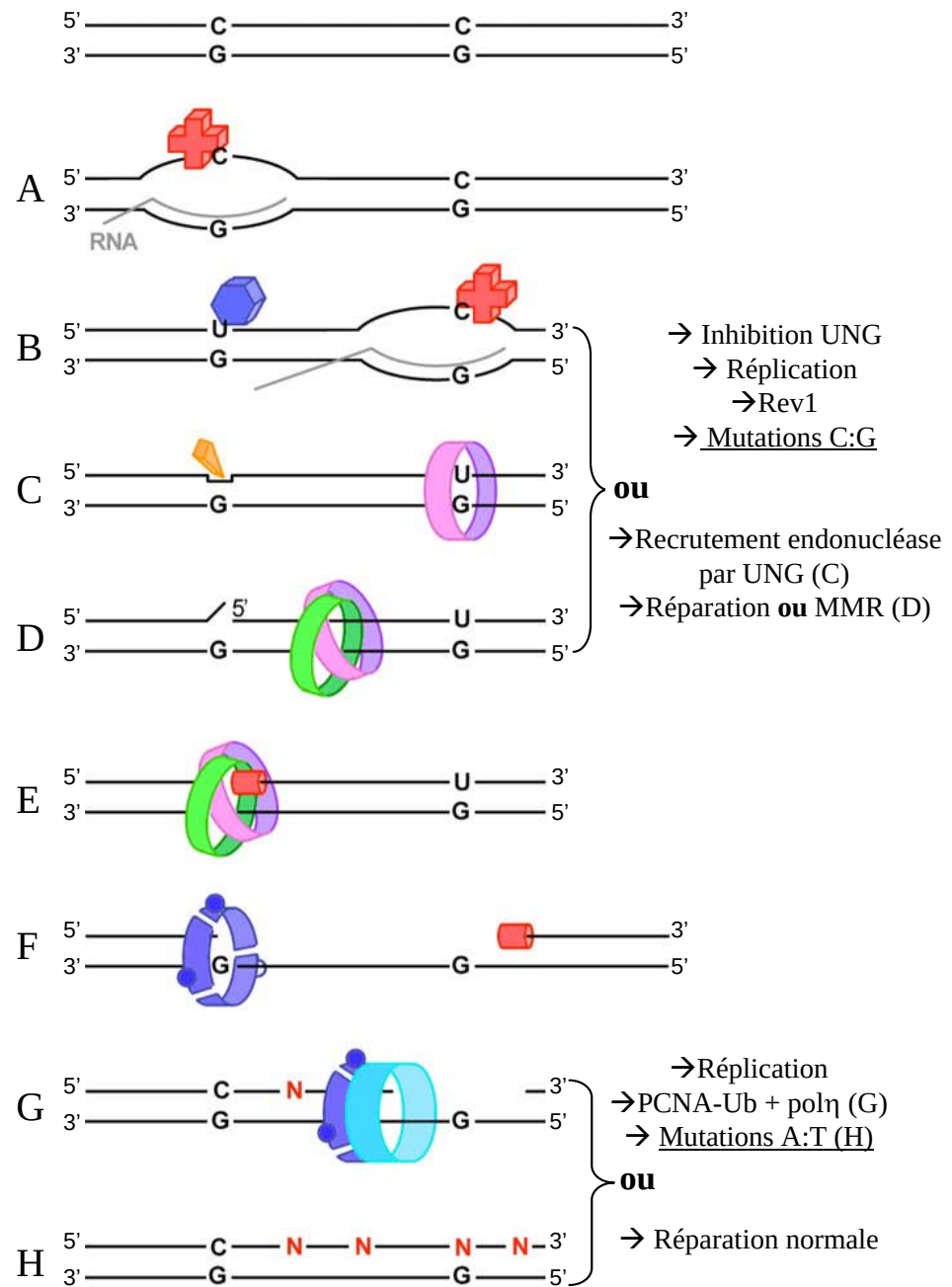
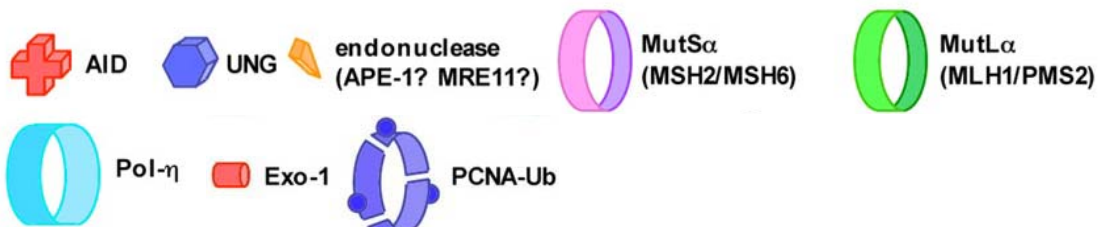


Figure 15 : Modèle possible du mécanisme des hypermutations adapté de Schanz *et al* [153]. La figure est décrite plus en détail dans le texte.



régions variables ou les régions S. Le complexe AID actif (accompagné des domaines catalytiques de la PKA et de RPA) désamine donc une cytidine dans la boucle de transcription (figure 15A). Dans cet exemple, la désamination se fait sur le brin codant (figure 15A) mais elle peut également se faire sur le brin non-codant dans des régions super-enroulées autour de la bulle de transcription [111]. Un premier uracile est normalement reconnu par le système BER mais le mécanisme peut être interrompu au niveau d'UNG. Le mésappariement va alors persister jusqu'à la réplication où il sera pris en charge par Rev1 qui y insèrera une mutation (figure 15B). La désamination par le BER peut également continuer par le recrutement d'une endonucléase (par le biais d'UNG) qui va retirer l'U et former un site abasique (figure 15C). L'apparition d'un deuxième mésappariement U:G en 3' (à 1kb maximum de distance) du site abasique va alors permettre au système MMR d'opérer. MutS α reconnaît d'abord le mésappariement, puis accompagné de MutL α , il va « glisser » jusqu'au site abasique (figure 15D). Notons que MutL α n'est nécessaire que dans le sens 3'→5' [153]. A ce niveau, le complexe va recruter Exo1 (figure 15E) qui va dégrader le brin d'ADN jusqu'à environ 150 nt après le mésappariement (figure 15F). Le domaine simple brin va être reconnu par PCNA ubiquitiné qui va certainement recruter pol η lors de la réplication. Cette polymérase va alors synthétiser le brin complémentaire en générant des erreurs au niveau des appariements A:T (figure 15G).

Notons cependant que, contrairement à UNG et MSH2, l'inactivation de PCNA et les KO Rev1 et pol η n'affectent que les mutations somatiques mais pas la commutation de classe. Il est donc possible que ces trois enzymes soient recrutées uniquement pour les mutations somatiques par les éléments du BER et du MMR. UNG et MutS α recruteraient alors d'autres enzymes durant la commutation de classe qui seraient à l'origine de cassures double-brin indispensables pour ce mécanisme. Le modèle présenté par Schanz *et al* [153] ne s'applique donc probablement qu'aux mutations somatiques. Dans le cas de la commutation de classe, le fort taux de séquences répétées dans les régions S provoquerait une augmentation de la fréquence de désamination d'AID qui finirait par générer des cassures double-brin [92, 149].

Cependant, ce modèle ne permet pas d'expliquer complètement le biais observé entre les deux brins d'ADN dans les mutations somatiques (table 2). En effet, en suivant ce modèle, il devrait y avoir autant de mutations sur les deux brins. Or ce n'est pas le cas : les A du brin non-codant sont moins souvent mutés que ceux du brin codant. Ce biais ne peut pas s'expliquer par le choix préférentiel d'un des deux brins par AID car les G mutés sur le brin codant sont soit plus nombreux, soit aussi nombreux que les C mutés (table 2). Ceci

signifierait donc que les C sont plus (voire autant) mutés sur le brin non-codant. Un autre modèle a donc été proposé sous le nom de modèle par transcription inverse [77, 88] (figure 16).

III.3.5.2. Modèle par transcription inverse

Ce modèle rajoute une étape supplémentaire par rapport au précédent en impliquant l'ARN en cours de synthèse et est basé sur plusieurs observations. La première de ces observations est que la RNA polymérase II est capable de transcrire des sites abasiques tout comme des U sans faire de pause [154]. Plus précisément, elle transcrira un C face à un site abasique et un A ou un G face à un U (figure 16A). De ce fait, les désaminations générées par AID sur le brin non-codant avant sa transcription permettent d'obtenir un ARN avec des erreurs. Deuxièmement, il a été montré *in silico* qu'il y a une corrélation importante entre les structures secondaires des ARN V κ et les mutations apparaissant sur les motifs WA, cibles des adénosines désaminases (ADAR) [88]. Ces désaminations modifieraient les A en I sur l'ARN et seraient la cause des mutations sur les appariements A:T (figure 16A). Cette observation est d'autant plus consistante qu'ADAR-1 est couplé à la RNA polymérase II [77]. Enfin, la troisième observation est que la polymérase η présente des capacités de transcriptase inverse [77, 88]. Ainsi, dans ce modèle, les brins codants et non-codants sont les cibles d'AID mais uniquement le brin codant est indirectement la cible des ADAR. En effet, la désamination des A en I sur l'ARNm provoquerait une erreur lors de la transcription inverse du brin non-codant. Cette erreur apparaîtrait alors comme une mutation du A sur le brin codant (figure 16C-D). De ce fait, les A seraient plus fréquemment mutés sur le brin codant que sur le brin non-codant. Ce modèle permet ainsi d'expliquer le biais de mutations observé entre les 2 brins d'ADN. Aucune étude n'a cependant montré pour l'instant un lien entre une adénosine désaminase et les mutations somatiques et/ou la commutation de classe.

Il reste donc plusieurs points à clarifier dans les mécanismes des hypermutations et de la commutation de classe avant de pouvoir établir un modèle définitif.

IV. Phylogénie de la réponse humorale

IV.1. Apparition de la réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire spécifique est un gros avantage évolutif car elle permet, *via* la recombinaison VDJ, de créer une grande variabilité de récepteurs qui peuvent reconnaître spécifiquement une grande diversité d'antigènes, et donc de microbes. Mais elle permet

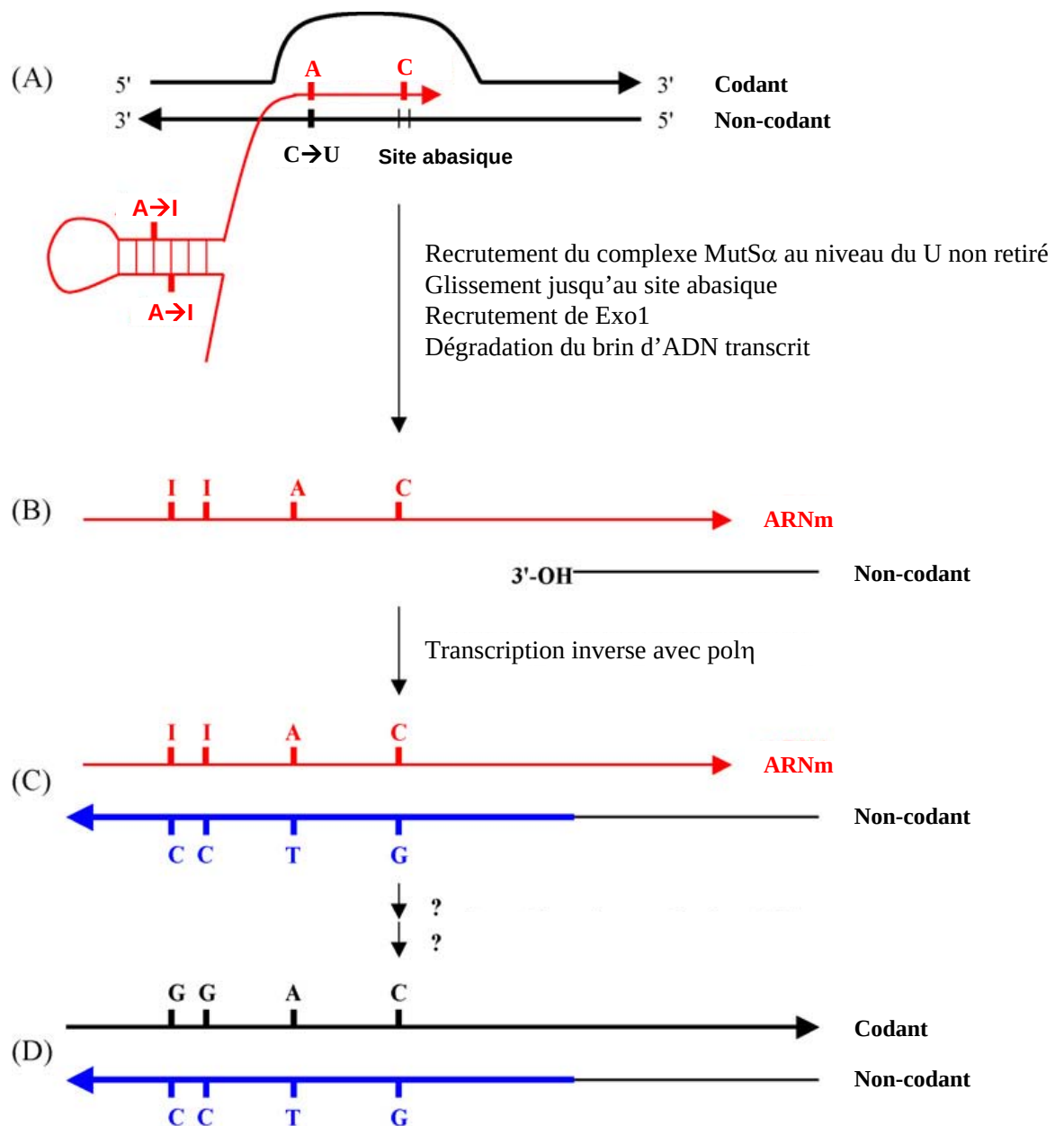


Figure 16: Modèle des mutations par transcription inverse. **A)** La RNA polymérase II introduit des mutations dans l'ARNm en copiant les lésions provoquées par AID sur le brin non-codant. Le site abasique est issu de la réparation inachevée par le mécanisme BER (figure 15). En parallèle, l'ARN déjà synthétisé forme des structures secondaires près de la bulle de transcription qui sont reconnues par ADAR-1 fixée à la RNA-polymérase II. **B)** Comme dans le modèle de Schanz *et al* (figure 15) MutSα reconnaît le mésappariement, glisse jusqu'au site abasique où il recrutera Exo1. Exo1 va alors dégrader le brin jusqu'à environ 150 pb au delà du mésappariement. **C)** La polymérase η va ensuite resynthétiser la partie dégradée du brin non-codant par transcription inverse de l'ARN (contenant différentes erreurs). **D)** Par une série d'étapes pour l'instant encore inconnues, les mutations sont intégrées sur le brin codant. Adapté de Steele E.J. [77].

également d'améliorer, par les mutations somatiques, et d'adapter, grâce à la commutation de classe, une réponse afin de lutter efficacement contre l'antigène ciblé. Cette immunité adaptative semble être apparue il y a 500 millions d'années lors de la séparation des vertébrés à mâchoire de ceux sans mâchoire (qui aujourd'hui ne sont plus représentés que par la lamproie et la myxine). En effet, les premiers vertébrés à mâchoire, tels que les poissons cartilagineux (les requins et les raies) possèdent un thymus dans lequel les lymphocytes T sont différenciés et des tissus hématopoïétiques dans lesquels les lymphocytes B sont différenciés [155]. Aucune structure ressemblant au thymus n'a jusqu'à présent été découverte chez les vertébrés sans mâchoires. Cependant, les lamproies sont capables de développer une réponse immunitaire adaptative contre des bactéries ou des globules rouges humains de type O [156, 157]. Malgré la complexité des antigènes présents à la surface des érythrocytes, les protéines qui ont agglutiné les cellules de types O ne sont pas capables d'agglutiner des cellules de type A ou B, démontrant bien l'existence d'une réponse spécifique. Cette réponse immunitaire est en fait médiée par des récepteurs variables de lymphocytes, les VLR, qui sont très différents des immunoglobulines (figure 17A-B). Ce sont des monomères d'environ 270 acides aminés [158] alors que les immunoglobulines sont des tétramères dont la totalité représente environ 1330 acides aminés. Par contre, comme les Ig, ces récepteurs possèdent une partie variable et une partie constante et sont fabriqués par des cellules qui ont une ressemblance morphologique avec les lymphocytes des vertébrés à mâchoire. Ces VLR sont classés en deux groupes : les VLRA et les VLRB [157]. L'organisation génétique des VLRA n'a pas encore été déterminée mais leur mécanisme de fabrication semble être dépendant de CDA1, une cytidine désaminase proche d'AID [157]. Quant aux VLRB, ils sont codés sur un seul locus génomique qui contient une large banque de segments codant des éléments variables riches en leucine, les LRR. Ces éléments sont insérés somatiquement dans un gène VLR incomplet [158] (figure 17C). Cette recombinaison serait due au facteur CDA2, une autre cytidine désaminase proche d'AID [157]. Ce mécanisme de réarrangement n'est donc pas comparable à la recombinaison V(D)J mais il permet également de créer un répertoire variable de VLRB. Il est intéressant de noter que chaque lymphocyte exprime un VLRB avec un réarrangement de LRR unique (en nombre et en composition) ce qui signifie que chez ces animaux, l'exclusion allélique existe également [158]. Par ailleurs, les cellules exprimant les VLRA et VLRB représentent deux populations de lymphocytes distinctes avec une distribution tissulaire caractéristique. De manière intéressante, les gènes exprimés par les cellules VLRA⁺ sont des orthologues de gènes typiquement retrouvés dans les lymphocytes T. De plus, ces cellules répondent

préférentiellement à des mitogènes des lymphocytes T comme la PHA (phytohémagglutinine) ce qui laisse supposer que les cellules VLRA⁺ sont les équivalents des lymphocytes T chez la lamproie. Enfin, en réponse à une immunisation, les cellules VLRB⁺ se différencient en plus grosses cellules ressemblant à des plasmocytes sécréteurs de VLR [156-158] ce qui les identifie comme étant les équivalents des lymphocytes B chez la lamproie.

Etant donné la différence qui existe entre les Ig et les VLR, tout laisse à penser que les VLR ne sont pas les « ancêtres » des Ig mais bien une autre forme de réponse immunitaire adaptative. Ces exemples montrent donc que des stratégies différentes ont été créées au cours de l'évolution pour générer des récepteurs variables de lymphocytes. Chez les vertébrés à mâchoires il s'agit des immunoglobulines, et chez les vertébrés sans mâchoire, ce sont les VLR.

IV.2. Les isotypes d'immunoglobulines chez les vertébrés

Le nombre d'isotypes d'anticorps varie entre les différentes classes de vertébrés à mâchoire. Pendant longtemps, on a pensé que ces variations étaient liées à la phylogénie, le nombre d'isotypes augmentant avec le degré d'évolution. Ainsi les mammifères seraient les plus évolués avec leurs 5 isotypes d'anticorps (IgM, IgG, IgD, IgA et IgE). Cependant, depuis quelques années, plusieurs groupes ont découvert de nouveaux isotypes chez les poissons et les amphibiens contredisant de ce fait cette idée (figure 18).

Ainsi, les amphibiens anoures expriment 5 isotypes d'anticorps : IgM, IgY, IgX et deux isotypes récemment découverts : les IgD et IgF. Les IgX et IgY de xénope sont respectivement l'équivalent physiologique des IgA et des IgG des mammifères. Les IgD de *Xenopus tropicalis* comportent 8 domaines constants et sont exprimés à la surface des cellules B portant une IgM. Les chaînes lourdes d'IgF possèdent deux domaines constants et une région charnière codée par un exon séparé. C'est l'exemple le plus précoce, au cours de l'évolution, d'un isotype avec une région charnière codée séparément [159].

L'axolotl mexicain, *Ambystoma mexicanum*, est l'urodèle dont on connaît le mieux le système immunitaire. Cet amphibien possède deux populations de lymphocytes B, une qui fabrique des IgM et l'autre qui fabrique des IgY [160]. Les IgY d'*A. mexicanum* auraient la même fonction que les IgA des mammifères et que les IgX du xénope [161].

Cinq isotypes ont été décrits chez les poissons osseux : IgM, IgD, IgH, IgT et IgZ [162-164]. Il existe une variation considérable du nombre d'exons Cδ entre les différentes espèces de ces poissons [165-169]. Par exemple, 17 exons Cδ ont été décrits chez le poisson zèbre alors que 7 exons sont retrouvés chez le fugu. De plus, chez le poisson chat, le saumon, la

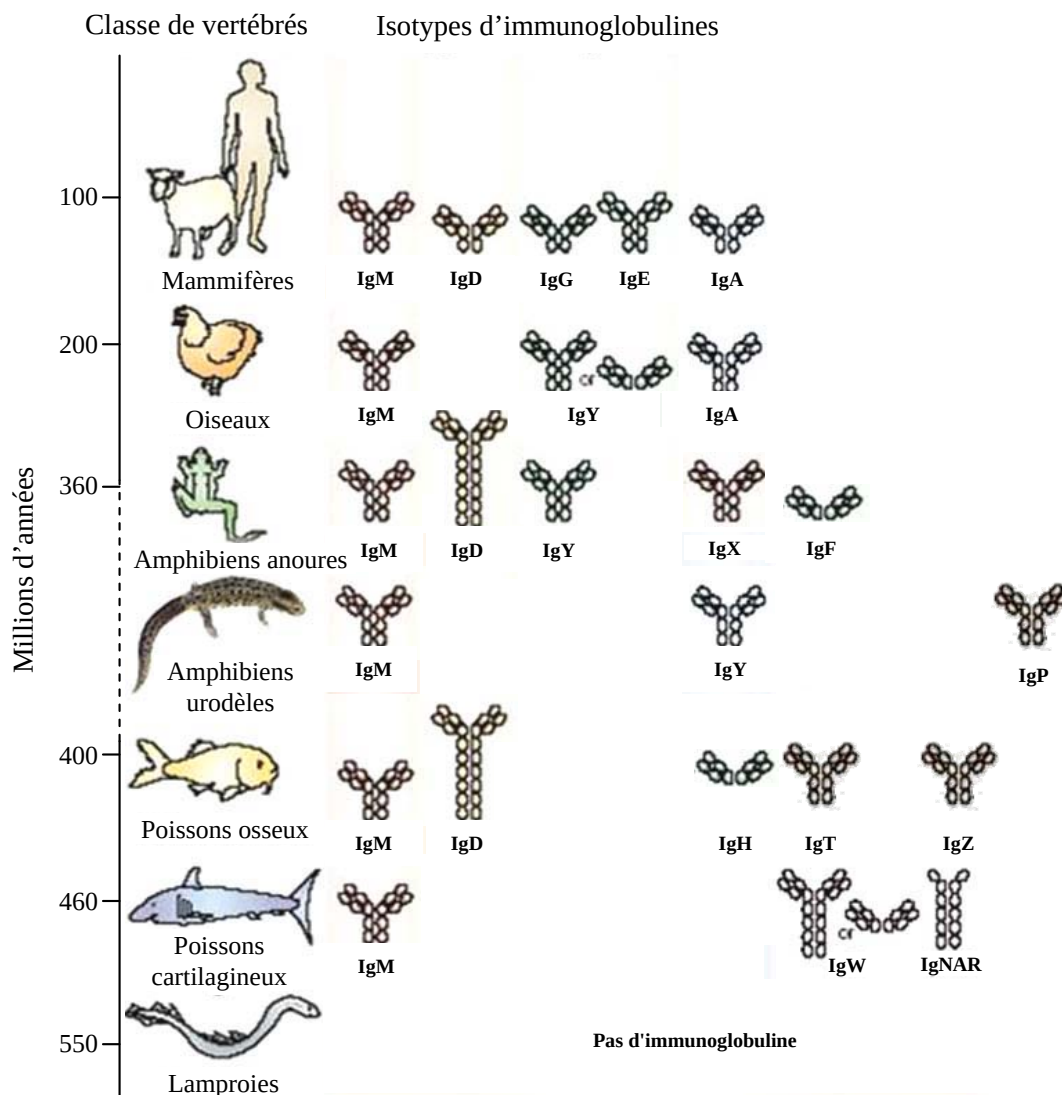


Figure 18: Les différents isotypes d'Ig identifiés chez les vertébrés. Chaque colonne représente des isotypes différents. Les isotypes d'une même colonne ont des fonctions similaires. Contrairement aux anoures, les IgY des urodèles sont l'équivalent des IgA de mammifères. Adapté de Flajnik [155]

morue et la plie japonaise, la chaîne lourde d'IgD est fabriquée à partir d'une molécule chimérique d'ARN comprenant le premier domaine constant des IgM épissé sur C δ 1 [165, 168-170]. Cette fabrication présente des points communs avec ce qui est observé chez les mammifères. En effet, chez ces derniers, les IgD sont également issues de l'épissage alternatif d'un grand préARNm contenant les domaines C μ et C δ . De plus, comme chez les mammifères, la fonction des IgD chez les poissons n'est pas claire. Les chaînes lourdes d'IgT et IgZ sont composées de 4 domaines constants [162, 163]. Les IgZ sont exprimées dans les tissus lymphoïdes primaires chez le poisson zèbre alors que les IgT sont exprimées dans de nombreux tissus chez la truite suggérant de ce fait des différences fonctionnelles entre IgT et IgZ. Les IgH de fugu sont très différentes des IgT et des IgZ [164]. En effet, les chaînes lourdes d'IgH ne sont composées que de deux domaines constants. Cet anticorps est principalement associé aux muqueuses ce qui en fait l'orthologue des IgA des mammifères.

Enfin, trois isotypes d'anticorps ont été décrits chez les poissons cartilagineux : IgM, IgNAR et IgW [155]. IgNAR et IgW sont spécifiques aux poissons cartilagineux et sont composés de chaînes lourdes à six domaines constants. IgW serait l'orthologue des IgD du xénope [171]. IgNAR est composé uniquement de chaînes lourdes [172] et jusqu'à présent son rôle n'a pas été établi de manière certaine. Des anticorps fonctionnels uniquement composés de chaînes lourdes ont aussi été décrits chez des mammifères comme le chameau et le lama [173].

Les différentes classes de vertébrés à mâchoire possèdent donc des isotypes d'anticorps qui présentent, comme chez les mammifères, des différences fonctionnelles [155]. De plus certains sont des orthologues des isotypes présents chez les mammifères. Ainsi, les IgM et les IgD sont présentes chez toutes les classes de ces vertébrés indiquant que ces deux isotypes étaient présents chez l'ancêtre de tous les vertébrés à mâchoire [171]. Des Ig associées aux muqueuses (IgA, IgX, IgY ou IgH) sont également systématiquement retrouvées chez toutes ces espèces.

IV.3. Les répertoires de gènes VH

Les répertoires de gènes VH de différentes espèces d'animaux ont été étudiés. Au sein d'une espèce donnée, les séquences présentant au moins 75% de nucléotides identiques sont considérées comme appartenant à une même famille de gènes VH. Par exemple, chez l'homme, sur les 123 gènes VH connus, 82 gènes sont regroupés en 7 familles. Les 41 gènes VH restants sont des pseudogènes trop divergents pour pouvoir être classés dans une famille. La souris possède environ 200 gènes VH répartis en 15 familles, ce qui représente de très loin

la plus diverse organisation décrite chez les vertébrés [174]. D'autres espèces de mammifères disposent par contre d'un nombre plus restreint de familles VH. Ainsi, le répertoire VH du mouton dérive d'une unique famille comprenant 10 gènes, avec plus de 80% d'homologie entre eux [175]. Les quelques 100 gènes VH du lapin semblent appartenir à une même famille et le gène VH1 situé le plus en 3' est préférentiellement utilisé et somatiquement diversifié par conversion génique [155, 176]. Au cours de ce processus, de nombreux pseudogènes VH échangent de courtes séquences nucléotidiques avec le gène VH réarrangé de manière fonctionnelle [177, 178]. Ce phénomène est également observé chez le poulet.

Quant au xénope (*Xenopus laevis*) et à l'axolotl mexicain (*Ambystoma mexicanum*), ils possèdent chacun 11 familles de gènes VH [179, 180].

Parmi les espèces de poissons téléostéens les plus étudiées on trouve le poisson-chat d'Amérique (*Ictalurus punctatus*) qui possède 13 familles de gènes VH, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et le saumon (*Salmo salar*) qui disposent de 11 familles de gènes VH [181, 182] alors que le poisson zèbre (*Danio rerio*) n'en a que 4 [183]. Cette liste n'est pas exhaustive. De plus nombreuses informations sur les familles de gènes VH dans différentes espèces animales sont disponibles sur le site IMGT (<http://imgt.cines.fr>), rubrique 'Gene tables' dans 'IMGT repertoire'.

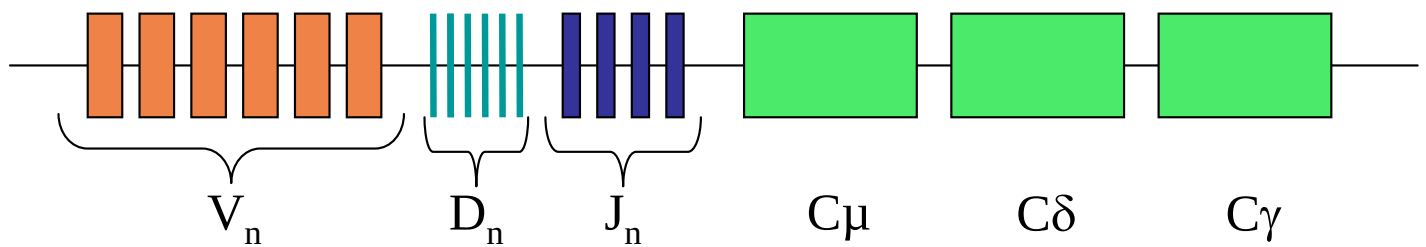
Le nombre de familles de gènes VH varie donc d'une espèce à l'autre mais ces variations ne sont pas liées à la phylogénie.

IV.4. Organisations des loci d'anticorps chez les vertébrés

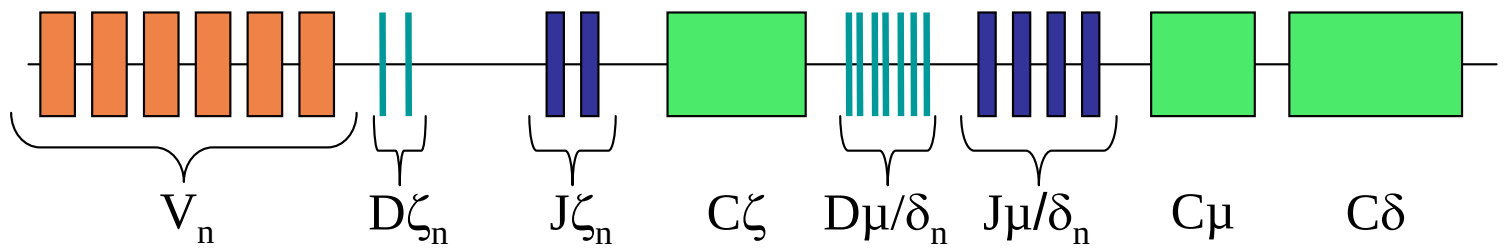
Les loci de chaînes lourdes d'immunoglobulines ne sont pas organisés de la même manière dans toutes les classes de vertébrés. L'organisation la plus commune est l'organisation en translocon (figure 19A). Elle est présente chez les mammifères, les oiseaux, les amphibiens anoures et certains poissons osseux [91]. Dans cette organisation, des groupes d'exons V, D et J précèdent les exons codant les différents domaines constants. Chez les poissons osseux comme le poisson zèbre, l'organisation est très semblable à celle des mammifères (figure 19B). Les chaînes lourdes des IgZ (C ζ), des IgM et des IgD utilisent le même groupe de gènes V mais des éléments D et J différents. Ceci est dû au fait que le gène C ζ possède son propre lot d'éléments D et J [163].

Chez d'autres poissons osseux, cette organisation peut changer. Par exemple, chez le cœlacanthe, chaque chaîne lourde est codée par un locus génomique différent et chaque gène CH possède son lot de gènes V, d'éléments D et J [91] (figure 19C).

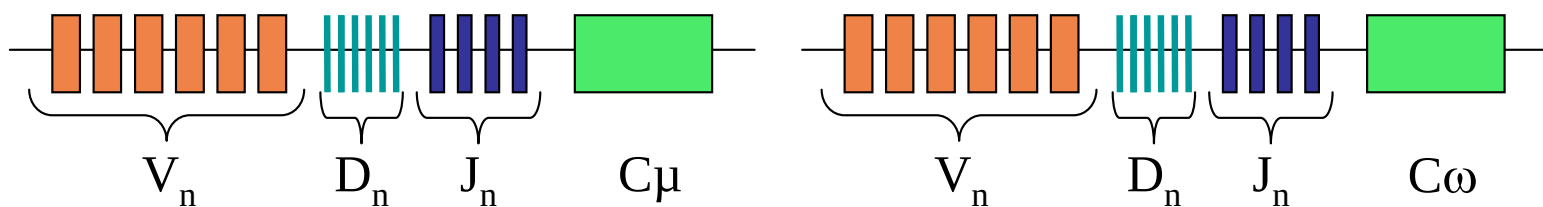
A) Organisation en translocon



B) Organisation en translocon chez le poisson zèbre



C) Organisation en translocon chez le coelacanth



D) Organisation en cluster

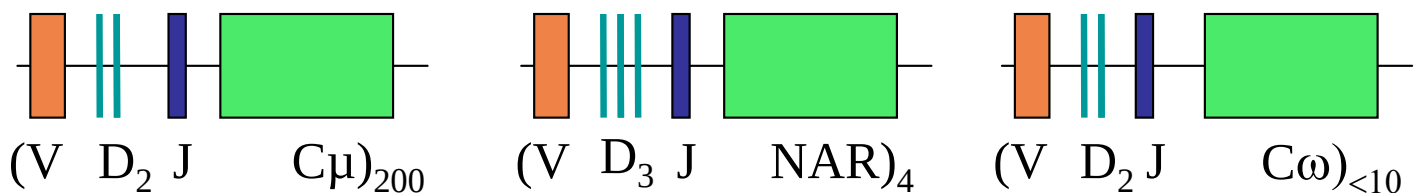


Figure 19: Schéma des différentes organisations des gènes de chaînes lourdes d'anticorps. **A)** Organisation en translocon (la plus répandue): un nombre variable (n), selon l'espèce, de gènes V , de segments D et de segments J se succèdent. Les exons codant les régions constantes des différentes chaînes lourdes s'enchaînent ensuite derrière. **B)** Chez les poissons osseux comme le poisson zèbre, l'organisation en translocon est proche de celle des mammifères mais les domaines constants possèdent leur propres éléments D et J . **C)** Chez les coelacanth, l'organisation en translocon est un peu particulière car chaque chaîne lourde est codée en un locus différent et possède son lot de gènes V , de segments D et J . **D)** L'organisation en cluster est retrouvée chez les poissons cartilagineux. Chaque chaîne lourde est codée sur un locus génomique différent. Un groupe composé d'un gène V , 2 ou 3 éléments D , un élément J et le domaine constant sont répétés plusieurs fois.

Chez les poissons cartilagineux, les différents loci de chaînes lourdes sont séparés et ne peuvent pas réarranger entre eux. Ces loci présentent chacun une organisation très particulière appelée organisation en cluster (figure 19D). Chaque locus est organisé en répétitions de groupes contenant à chaque fois un gène V, 2 ou 3 éléments D, un élément J et le domaine constant.

L'organisation génomique des loci de chaînes lourdes semble donc suivre l'évolution. Il semblerait que les loci des différents isotypes d'anticorps étaient initialement séparés, puis au travers de l'évolution ils se sont organisés pour ne former qu'un seul locus.

IV.5. La recombinaison V(D)J dans les différentes classes de vertébrés

La recombinaison V(D)J est conservée dans toutes les espèces fabriquant des anticorps. Certains facteurs indispensables à ce phénomène, comme les protéines RAG et la TdT, ont été identifiés chez les poissons et chez les amphibiens [155, 184-187].

Chez l'homme et la souris, la recombinaison V(D)J a lieu tout au long de l'existence dans les lymphocytes B de la moelle osseuse. De ce fait, le répertoire des anticorps est constamment renouvelé [155]. Cependant cette observation n'est pas valable pour tous les mammifères. En effet, le lapin et le mouton ne réalisent pas de réarrangements tout au long de leur vie. Chez le lapin, ces réarrangements auront lieu du douzième jour de gestation jusqu'à l'âge de 3-4 mois [188]. C'est également le cas chez le poulet qui ne va réarranger ses gènes que durant une courte période de sa vie jusqu'à ce que la bourse de Fabricius régresse [155]. Par contre, ces animaux vont beaucoup plus utiliser des modifications somatiques comme la conversion génique ou les hypermutations pour varier leur répertoire d'anticorps [155]. Rappelons que chez ces animaux, le répertoire des gènes V est peu variable et essentiellement composé de pseudogènes. L'utilisation des modifications somatiques plutôt que la recombinaison V(D)J apparaît donc comme une adaptation chez ces espèces pour qu'elles puissent malgré cela avoir un répertoire hypervariable d'anticorps.

Chez le xénope, la recombinaison V(D)J a lieu tout au long de l'existence de l'animal mais des changements apparaissent entre le stade larvaire et l'animal adulte. Au stade larvaire, les CDR3 sont plus courts car il n'y a pas d'ajout de nucléotides N [185, 189]. Ceci est dû à un défaut d'expression de la TdT durant la vie larvaire de l'animal. Les éléments D participent énormément à la variabilité du CDR3 des chaînes lourdes du xénope, car plusieurs d'entre eux peuvent être rajoutés dans un même CDR et ils peuvent être insérés dans les 6 phases possibles de lecture [189, 190]. Cette flexibilité n'est pas aussi importante chez les mammifères. Cependant, le nombre total de lymphocytes chez le xénope est nettement moins

élevé que chez la souris, et ce, principalement à cause d'un nombre moins important d'organes lymphoïdes (il n'y a pas de ganglions lymphatiques). Un xénope possède approximativement 10^8 lymphocytes dans son organisme alors qu'une souris en possède le double uniquement dans la rate [189]. Chaque lymphocyte B n'exprimant qu'un réarrangement V(D)J, le répertoire d'anticorps sera nettement moins variable que chez les mammifères.

Les amphibiens urodèles présentent également un répertoire peu variable d'anticorps. Chez l'axolotl, cette faible variabilité est notamment due à un faible nombre d'éléments D, l'ajout moins important de nucléotides N et l'apparition moins fréquente d'éléments P [191]. Ceci provoque une diversité moins importante des CDR3 de chaînes lourdes. Par ailleurs, chez le pleurodèle, le gène RAG1 est très faiblement exprimé à partir de 2 ans ce qui laisse supposer que la recombinaison V(D)J n'est plus effective [184]. Ainsi les urodèles, fabriqueraient un répertoire uniquement durant les premières années de leur existence qui ne serait pas ou peu réalimenté par la suite.

Chez les poissons cartilagineux, le fait que RAG1 soit exprimé tout au long de l'existence indiquerait que la recombinaison V(D)J s'effectue jusqu'à la fin de la vie [192]. La variabilité des anticorps est cependant faible chez ces animaux [193]. Chez la raie, les segments VH présentent une très forte homologie (de l'ordre de 90%), y compris dans les régions CDR1 et 2, ce qui explique cette faible diversité. L'organisation en cluster des gènes VH semble également contribuer à ce manque de diversité (figure 19D). Les CDR3 présentent, quant à eux, une variabilité importante car ils peuvent contenir plusieurs segments D [194, 195]. Par ailleurs, plusieurs embryons peuvent exprimer des chaînes lourdes dont les segments V, D et J ont été réarrangés de manière identique [192, 196]. Ces observations sont dues à des pré-réarrangements qui auraient lieu dans les gonades des parents et qui permettraient à l'embryon de répondre très tôt à une infection [196].

IV.6. Evolution de la commutation de classe et des hypermutations

Tous les vertébrés à mâchoire sont donc capables de fabriquer un répertoire d'anticorps. Cependant la capacité d'augmenter l'affinité de leurs anticorps suite à une stimulation antigénique est apparue plus tard dans l'évolution. En effet, chez les poissons et les amphibiens, la maturation de l'affinité des anticorps est faible après une stimulation antigénique. Cette faible augmentation de l'affinité est corrélée à l'absence de centres germinatifs chez ces animaux [155]. Par ailleurs, l'ablation du thymus chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl* a peu d'effet sur sa réponse humorale [197] alors que les

lymphocytes T helper jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes B lors d'une réponse immunitaire chez les mammifères.

IV.6.1. La commutation de classe chez les amphibiens et les poissons

Le fait qu'il y ait différents isotypes d'anticorps pour toutes les espèces de vertébrés à mâchoire ne signifie pas pour autant que la commutation de classe soit conservée au cours de l'évolution. En effet, plusieurs études ont montré que cette dernière n'a pas lieu chez les poissons [91, 155]. L'absence de commutation de classe aura un effet conséquent sur la qualité de la réponse humorale, car l'isotype avec le plus d'affinité pour l'antigène ne sera pas forcément le plus adapté à son élimination. Quel facteur est donc responsable de cette absence?

Chez les poissons cartilagineux, cette absence peut être expliquée par le fait que les différents loci de chaînes lourdes sont séparés contrairement à ce qui est observé chez les mammifères. Mais le fait que cette séparation physique empêche la commutation de classe est un argument discutable. AID peut en effet induire des translocations chromosomiques entre le gène C-myc et le locus des chaînes lourdes dans les plasmocytomes et les lymphomes de Burkitt [198-200]. Cette protéine est donc tout à fait capable de réunir des loci très éloignés. De plus, AID est présente et fonctionnelle chez les poissons et les amphibiens [109, 127, 201]. Des études ont en effet montré qu'AID du poisson zèbre, du poisson chat, du fugu et du xénope étaient capables d'induire la commutation de classe dans des cellules transfectées [202-205]. La protéine AID du fugu et du poisson chat présentent cependant une efficacité moins importante que la protéine du zebrafish et du xénope. De plus, AID est surexprimée chez le xénope après une stimulation antigénique et est retrouvée dans les organes lymphoïdes secondaires mais également au niveau de muqueuses ou de sites infectieux [127]. Chez le poisson chat, AID est également majoritairement retrouvée dans la rate mais aussi dans l'intestin ou les nageoires [201]. Ces observations laissent supposer que la maturation de l'affinité a lieu directement sur le site de rencontre avec l'antigène chez les vertébrés à sang froid étant donné qu'ils n'ont pas de ganglions lymphatiques. Par contre, les poissons semblent être dépourvus de régions S, indispensables à la commutation de classe. De manière intéressante, cette région est également absente en amont des IgD chez l'homme [91].

Les amphibiens anoures seraient les espèces les plus primitives où un changement d'isotype d'anticorps est observé suite à une immunisation [189]. Ce sont également les espèces les plus primitives où des régions S ont été trouvées. La région S μ d'environ 5kb a été identifiée dans l'intron entre le segment JH et le gène C μ de *X. laevis*. Elle contient 23

répétitions de séquences palindromiques, telles que AGCT, mesurant chacune environ 150pb. La région S χ (en amont du domaine C χ des IgX) ne présente pas d'homologie de séquence avec S μ et contient des répétitions de 16 à 121pb des segments CATG, AGCA et TGCA [189, 206]. Ces régions S ne sont cependant pas riches en répétitions G contrairement à ce qui est observé chez les mammifères. De ce fait, ces régions ne sont pas capables de former les boucles R nécessaires à la commutation de classe. Pourtant, ces régions peuvent remplacer les régions S chez la souris [207]. La capacité de former des boucles R serait en fait remplacée par les motifs AGCT ou AGCA qui sont des séquences RGYW, les cibles préférentielles d'AID [207].

IV.6.2. Les mutations somatiques chez les amphibiens et les poissons

Des hypermutations ont été décrites dans les gènes d'anticorps chez les vertébrés à sang froid. Chez le xénope, ce taux de mutations est 4 à 7 fois plus faible que chez les mammifères. De 0 à 4 mutations apparaissent par séquence. Celles-ci sont localisées dans les CDR1 et 2, mais également dans les régions FR des gènes VH. De plus, les mutations sont plus souvent silencieuses que chez les mammifères. Le biais observé entre les paires de bases G:C et A:T n'est pas non plus le même : les bases G et C sont plus touchées que les bases A et T. Toutes ces observations suggèrent que le xénope ne possède pas un mécanisme efficace permettant de sélectionner les mutants de meilleure affinité ce qui est certainement dû à l'absence de centres germinatifs [190]. A nouveau, la faible efficacité des hypermutations n'est pas due à AID, car plusieurs études ont démontré que la protéine AID du xénope est capable d'induire des mutations somatiques [204].

Chez les poissons osseux, le profil des mutations n'a pas été étudié. Cependant, l'évidence qu'une maturation de l'affinité existe chez ces poissons a été démontrée. Chez la truite, l'affinité des IgM pour un antigène augmente progressivement suite à une immunisation [208, 209]. De plus, chez le poisson zèbre un nombre non négligeable de mutations a été observé sur des ADNc fabriqués à partir de gènes VH1 mais il n'est pas possible de savoir si ces mutations sont dues à des gènes VH1 différents ou à des mutations somatiques [183]. Cependant, des études récentes ont montré que les protéines AID du fugu, du poisson zèbre ou encore du poisson chat sont capables d'induire des mutations dans des bactéries ou des cellules de mammifères transfectées [202-204]. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail les mutations somatiques chez ces espèces.

Des hypermutations ont été décrites chez le requin, surtout au niveau des IgNAR. De manière intéressante, pour ces Ig, le profil des mutations est très proche de celui observé pour

les IgG des mammifères. Les codons sérine AGC et AGT sont plus fréquemment touchés. La fréquence des mutations est similaire à celle mesurée chez les mammifères. Les transitions sont plus fréquentes et les C et A, mais pas les G, sont plus fréquemment mutés [210, 211]. De plus, certains clones présentent des mutations provoquant systématiquement un changement en aspartate ou en glutamate (deux acides aminés chargés négativement). Toutes ces observations suggèrent donc une maturation suite à une stimulation antigénique. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée récemment par Stanfield *et al* [212, 213] qui ont montré que les mutations augmentent d'un facteur 10 l'affinité de l'anticorps pour son antigène. Ces observations se limitent exclusivement à cet isotype car pour les IgM, le profil est plus proche de celui observé chez le xénope [211]. Ceci laisse supposer que les IgNAR sont les principaux anticorps utilisés dans la réponse humorale des poissons cartilagineux [211]. Les raisons pour lesquelles les mutations sont plus élevées dans les IgNAR que dans les IgM du même animal ou du xénope restent cependant à déterminer. Existe-t-il deux mécanismes d'hypermutation chez les vertébrés à sang froid ? Si oui, existe-t-il un équivalent des IgNAR chez les amphibiens et les poissons osseux ? Par ailleurs, le changement dans le biais des mutations indique peut être un changement dans l'utilisation des facteurs de réparation de l'ADN qui agissent en aval d'AID.

V. Effet d'un vol spatial sur le système immunitaire

Les vols spatiaux représentent un modèle unique dans lequel plusieurs stress sont rencontrés de façon continue ou intermittente (figure 1, publication 1). Parmi ceux-ci on peut citer :

- les stress psychosociaux dus à l'isolement et au confinement,
- les stress physiques dus notamment aux augmentations importantes de la gravité générées lors du décollage et de l'atterrissage,
- l'augmentation des radiations,
- la perturbation du sommeil due à l'absence d'alternance jour/nuit,
- la microgravité,
- une moins bonne alimentation.

Cette multitude de stress a de profonds effets immunosuppresseurs sur l'être humain et sur les animaux pouvant ainsi compromettre leurs défenses face aux infections et aux tumeurs. Ainsi, lors des missions Apollo et Skylab, les astronautes ont présenté des fonctions immunitaires altérées et une vulnérabilité accrue aux infections [214]. Un autre risque

important auquel les astronautes sont soumis est le développement de pathogènes dans un environnement où l'air, les déchets et l'eau sont recyclés. Toutefois, les projets de missions de longues durées continuent de se développer. Un retour de l'homme sur la Lune, avec la mise en place d'une station habitée pour les missions humaines vers Mars, est prévu pour 2020 [215]. Il devient donc important d'approfondir nos connaissances sur les altérations du système immunitaire associées aux vols spatiaux afin d'assurer la survie des astronautes dans les stations spatiales et de rendre possible une habitation sur la Lune. La publication 1 ci-jointe présente les effets d'un vol spatial sur la croissance microbienne, leur virulence, l'immunité innée et adaptative. Cette publication, résumée ci-dessous, démontre la nécessité d'améliorer nos connaissances des effets des vols spatiaux sur le système immunitaire avant d'entreprendre des voyages prolongés dans l'espace.

V.1. Croissance, résistance et virulence microbienne

Plusieurs études ont montré que la croissance de certains microorganismes tels que *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Cupriavidus metallidurans* et *Bacillus subtilis* est modifiée lors de vols spatiaux [216, 217]. D'autres études ont démontré que la microgravité affecte la physiologie des microorganismes, leur expression génique et leur pathogénicité [218]. De plus, les bactéries prolifèrent mieux en microgravité. Il semble donc être plus facile pour les microbes d'établir des foyers infectieux dans ces conditions car les missions spatiales stimulent leur croissance et ont un impact négatif sur les fonctions immunitaires. De plus, les antibiotiques sont moins efficaces dans l'espace [219, 220].

V.2. Organes lymphoïdes et sous-populations cellulaires

Plusieurs études ont montré qu'un vol spatial affecte les organes lymphoïdes. Durnova *et al* [221] ont ainsi observé une hypoplasie des organes lymphoïdes (thymus, rate, ganglions lymphatiques) chez des rats qui ont séjourné en microgravité durant 22 jours. Similairement, Gridley *et al* [222] ont noté que des souris ayant volé durant 12 jours (mission STS-108), ont une masse splénique plus faible par rapport aux souris élevées dans des conditions similaires sur Terre et aux contrôles élevés dans des conditions standard. Ces observations ont été confirmées par une étude plus récente [223] montrant que des souris ayant volé durant 13 jours (mission STS-118) ont des thymus et des rates de masse plus faible. Néanmoins, les résultats concernant la masse thymique sont plus variables. En effet, suite à un séjour spatial,

celle-ci est parfois réduite [221, 223, 224], augmentée [225, 226] ou similaire aux contrôles restés sur Terre [227-229].

De nombreux travaux ont également montré qu'après un vol spatial, les populations de leucocytes sont modifiées dans le sang des astronautes et des animaux ainsi que dans les organes lymphoïdes d'animaux (table 1, publication 1). Ces changements peuvent être dues à une modification des molécules d'adhésion [230, 231] et à une redistribution des fluides corporels en microgravité [232]. Par exemple, une augmentation du nombre de neutrophiles circulants est généralement observée à l'atterrissage chez les astronautes et les animaux. Le stress généré par l'atterrissage peut expliquer cette observation en provoquant une mobilisation des neutrophiles de la moelle osseuse vers la circulation. Pour les autres populations cellulaires, des résultats variables ont été obtenus probablement à cause de différences dans la conception des expériences (marqueurs utilisés pour quantifier les cellules, durée du vol, variabilité individuelle, espèces utilisées lors de la mission, conditions d'élevage).

V.3. Immunité innée

Les fonctions des cellules de l'immunité innée sont également affectées par un vol spatial. Par exemple, les monocytes des astronautes ont une capacité réduite à phagocyter des bactéries *E. coli* [233, 234]. De plus, leur réponse à des toxines gram-négatives telles que le lipopolysaccharide (LPS) est modulée par les stress associés aux vols spatiaux [235]. Par ailleurs, les cellules NK ont une cytotoxicité diminuée chez les astronautes et les animaux ayant volé [236-238]. D'autres études ont montré un retard dans les réponses à des tests cutanés d'hypersensibilité pour des antigènes communs [234, 239-244]. La réactivation de certains virus latents comme les virus herpes [245-248] ou VZV (varicella-zoster virus) [249] est également un phénomène observé durant un vol spatial ou chez des souris suspendues par la queue ; un modèle couramment utilisé pour reproduire certains des effets des vols spatiaux sur l'organisme. Ces réactivations de virus latents sont corrélées à une diminution de la production d'IFN et à des taux élevés d'hormones de stress [247, 248, 250-254].

De plus, les vols spatiaux amplifient probablement les mécanismes anti-inflammatoires car il a été montré que les splénocytes des souris de la mission STS-118 produisent plus d'IL-6 et d'IL-10 et moins de TNF- α que les splénocytes des souris contrôle suite à une stimulation au LPS [223]. La même étude a montré que de nombreux gènes codant des protéines responsables de l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont surexprimés

après le vol, suggérant que les cellules essayent d'éliminer les ROS produits durant le vol spatial.

Enfin, les cellules progénitrices de la lignée granulocytaire et monocyttaire sont moins nombreuses chez des rongeurs ayant volés. Ce résultat est également observé pour les progéniteurs de la lignée monocyttaire chez des rongeurs suspendus par la queue [255-258]. Afin de déterminer comment le vol spatial affecte la différenciation des cellules de la lignée granulocytaire, Ortega *et al* [259] ont récemment étudié les cellules de moelle osseuse provenant de l'humérus des souris du vol STS-118. Leur étude indique que dans la moelle osseuse des souris ayant volé, les sous-populations cellulaires sont modifiées. En particulier, la différenciation en macrophages est augmentée et, en réponse à l'atterrissage, les neutrophiles sont activés.

V.4. Immunité cellulaire

Plusieurs groupes ont montré qu'en microgravité, l'activation des lymphocytes T est fortement inhibée [260-264]. Cette inhibition a plusieurs explications. Premièrement, l'expression génique de l'IL-2 et de son récepteur sont perturbées *in vitro* et *in vivo* en microgravité réelle et simulée [265, 266]. Or, cette cytokine intervient justement dans l'activation des cellules T (figure 2, publication 1). Deuxièmement, les lymphocytes T sont plus mobiles en microgravité, même en absence de mitogène, alors que la mobilité des monocytes est sévèrement diminuée dans une machine à positionnement aléatoire reproduisant les effets de la microgravité. Ceci pourrait gêner l'interaction entre lymphocytes T et la cellule présentatrice d'antigène et donc l'activation de la voie B7/CD28 (figure 2, publication 1). Troisièmement, il a été démontré récemment que la voie de signalisation de la PKA a un rôle clé dans l'inhibition de l'activation des lymphocytes T en microgravité [267].

Par ailleurs, il a été montré que la synthèse des cytokines TH1 (IL-2 et IFN γ) est diminuée chez les membres d'équipages lors de vols de longue et de courte durée à bord de la station spatiale internationale (ISS), [268]. Cette diminution résulte donc en une augmentation des cellules TH2 dont la fonction est de promouvoir l'immunité humorale et anti-helminthe [269]. Si ce changement persiste durant les missions de longues durées, il pourrait être responsable de maladies autoimmunes liées aux lymphocytes TH2, d'allergies et de maladies liées à une baisse de l'immunité cellulaire.

V.5. Immunité humorale

Peu de données sont disponibles concernant les effets des vols spatiaux sur l'immunité humorale. Il ne semble pas y avoir de changement significatif des taux plasmatiques d'immunoglobulines après des vols de courtes durées [231, 234, 270]. Par contre, des résultats différents ont été rapportés après des vols prolongés : Konstantinova *et al* [271] ont rapporté des taux sériques plus élevés d'immunoglobulines, particulièrement pour les IgA et les IgG, alors que Rykova *et al* [234] ont noté que les taux sériques d'IgA, d'IgG et d'IgM étaient inchangés après des missions prolongées.

Par ailleurs, les études concernant les effets d'un vol spatial sur la réponse immunitaire humorale induite par une stimulation antigénique sont rares. Les seuls travaux abordant ce sujet ont été publiés récemment [234, 272, 273]. En 2008, Rykova *et al* [234] ont rapporté que chez des astronautes, les taux plasmatiques d'anticorps spécifiques de différents virus latents n'étaient pas modifiés par un vol de courte ou de longue durée. Afin de déterminer si la réponse immunitaire humorale est affectée par un vol spatial, l'équipe Développement et Immunogénétique a réalisé l'expérience Genesis durant la mission spatiale Perseus. Durant cette mission, des pleurodèles adultes sont restés dans la station Mir pendant 5 mois, période durant laquelle ils ont été immunisés avec des protéines. A ce jour, ce sont les seuls animaux à avoir été immunisés dans l'espace. Ils font partie des rares vertébrés ayant séjournés dans une station spatiale pour une période aussi longue. Nos analyses ont montré que le taux d'ARNm de chaînes lourdes d'IgY (équivalent des IgA humaines [publication 2]) est augmenté dans la rate des animaux ayant volé. Nous avons également déterminé comment ces animaux ont utilisé leurs familles de gènes VH pour fabriquer leurs anticorps spécifiques en réponse à la stimulation antigénique. Nous avons noté que les familles VHII et VHVI sont utilisées en réponse à cette stimulation antigénique mais dans des proportions différentes (figure 20) [272]: les familles VHII et VHVI sont retrouvées respectivement dans 28% et 58% des chaînes lourdes d'IgM pour les animaux immunisés sur Terre et dans 61% et 24% des chaînes lourdes d'IgM pour les animaux immunisés à bord de Mir. Ces résultats pourraient s'expliquer par une modification de la distribution des lymphocytes dans l'organisme et/ou une modification de la sélection des lymphocytes B lors de la réponse immunitaire humorale en micropesanteur.

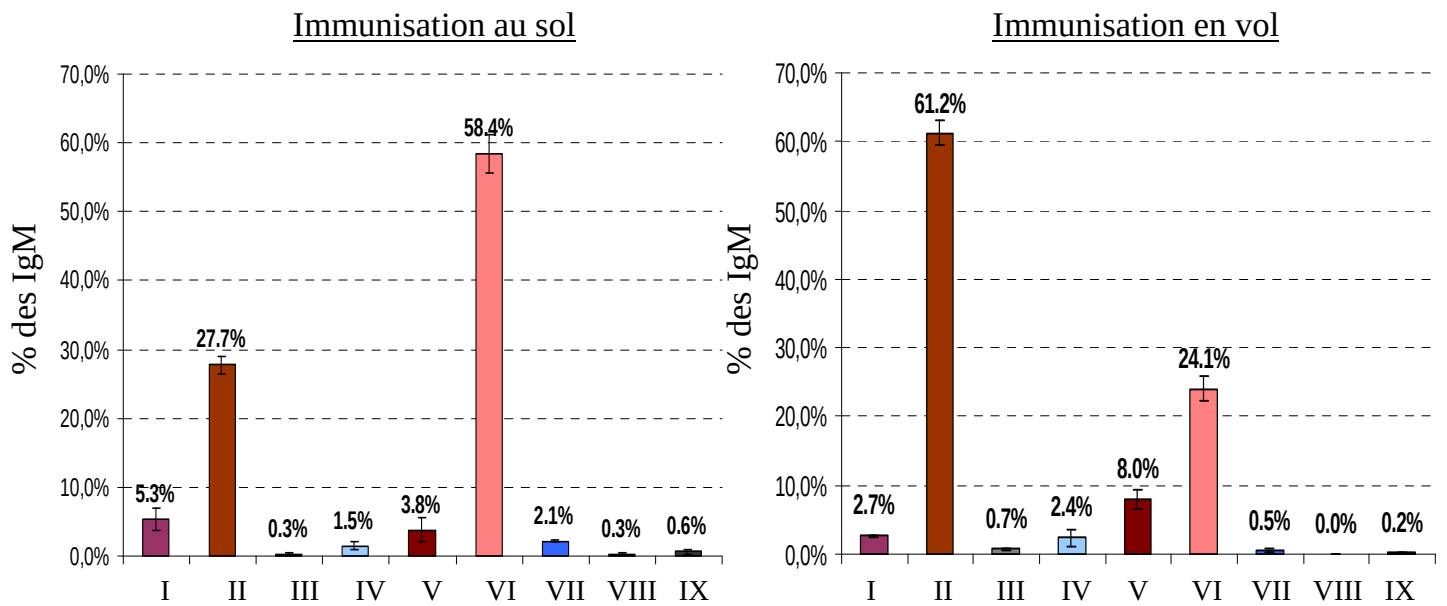


Figure 20: Contributions moyennes des 9 familles de gènes VH aux chaînes lourdes d'IgM exprimées suite à une immunisation au sol ou en vol chez des pleurodèles. Tiré de Boxio *et al* [271].

Publication 1 (*Journal of leukocyte biology*, 2009)

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

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

^{*}Nancy-University, Development and Immunogenetics group. Boulevard des Aiguillettes, BP 70239. F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France.

[†]University of Luxembourg, Life Sciences Research Unit. 162a, avenue de la Faïencerie. L-1511 Luxembourg.

Summary sentence: This review describes hazards present as humans explore space and focuses on the effects of spaceflights on immunity.

Running title: Spaceflight-associated immune system weakening

¹**Corresponding author:** Dr J.-P. Frippiat. Nancy-University. Boulevard des Aiguillettes, BP 70239. F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France. Tel: +33 3 83684494. Fax: +33 3 83684196. E-mail: Jean-Pol.Frippiat@scbiol.uhp-nancy.fr

Key words: microgravity, deep-space mission, immune depression, stress

Total character count: 38070; **number of figures:** 2 color figures; **number of references:** 155; **number of words in abstract:** 100; **number of words in summary sentence:** 18

Abstract

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

Introduction

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

On July 20, 1969, Neil Armstrong and Edwin Aldrin became the first humans to land on the Moon. This summer, we celebrate the 40th birthday of this historic event. A few years ago, President George W. Bush proposed a manned return to the Moon, with the Moon to become the staging post for manned missions to Mars [1]. President Barack H. Obama's 2010 budget request, released on February 26, 2009, confirmed that NASA will stay on track to return to the Moon by 2020. A mission to Mars and back will take a minimum of 520 days, of which roughly one month will be spent on the Martian surface, and the rest will be spent in transit. At its furthest, the crew will be some 360 million km away from home. Consequently, astronauts will have to exercise an unprecedented level of autonomy and teamwork [2]. During the mission, they will experience not only microgravity but also various forms of stress such as confinement, high expectations of performance, and risks of equipment failure or fatal mishaps. The enormous distance and long travel time to Mars will also probably affect the astronauts psychologically. The crew will therefore endure increased stress levels, radiation because neither the Moon nor Mars has magnetic fields or dense atmospheres that could attenuate them, and microgravity-induced changes such as alterations in body fluid distribution, which could influence their immune system. Since gravity has shaped the architecture of all biological systems on our planet, it is reasonable to observe aberrations in

normal functioning of life in weightlessness. A long-term spaceflight will also pose a multitude of health risks; not only those associated with spaceflight such as bone demineralization, skeletal muscle atrophy and immune system suppression (Figure 1), but also from common diseases that might cause specific problems under these circumstances. Another risk may be the development of pathogens in a closed environment where air, food, waste and water are recycled. Confinement of the crew during flight can and has resulted in the transfer of microorganisms between crew members [3, 4]. Finally, specific health risks might also be encountered on the lunar or Martian surface such as dust or chemicals that could irritate the respiratory tract, for example, or even new organisms. Indeed, three days on the Moon during the final Apollo mission in 1972 left astronaut Eugene Cernan weary and filthy with rock dust. A trip to Mars will certainly multiply the hazards of space travel.

Humans are ready to accept great risks in order to go where no one has gone before, but do we have sufficient and sound biological information to support prolonged space habitation, knowing that no humans can exist in space for a long time without science to support them? Returning astronauts have experienced altered immune function and increased vulnerability to infections during spaceflights dating back to the Apollo and Skylab missions [5]. Consequently, one may wonder if the weakening of the immune system could be a limiting factor for the expansion of human presence beyond Earth's orbit. This question is important to ensure survival in space stations and sustain habitation on the Moon and Mars. Most of our knowledge regarding the effects of spaceflight on the immune system results from the analysis of samples subjected to short spaceflights or ground-based simulations of spaceflight conditions. These studies revealed that spaceflights affect a variety of immune parameters in humans and in animals. In this paper we review the effects of spaceflight on microbial growth and virulence, lymphoid organs and cell populations, and innate and adaptive immunity, and we present countermeasures that have been developed to prevent

that the weakening of the immune system associated with spaceflight is an area that should be considered more before we undertake prolonged space voyages.

Microbial growth, resistance and virulence

Analysis of medical events among astronauts aboard the Mir space station, over a period from March 1995 to June 1998, revealed a significant number of episodes of microbial infections, including conjunctivitis, acute respiratory and dental infections [6]. Evidence for in-flight cross-contamination with opportunistic pathogens such as *Staphylococcus aureus* has been reported [7, 8]. Moreover, a study of the microflora of cosmonauts from five spaceflights indicated that the crew exchanged intestinal flora [9]. As the duration and frequency of space missions increase, the potential for infectious diseases to arise during flight may become a critical issue because microbial contamination will increase with time and require continued surveillance. Crew members are the predominant sources of bacteria, with other sources arriving with ground-supplied materials. Data from previous spaceflights have demonstrated that microorganisms are ubiquitous throughout the habitable modules of spacecrafts [8, 10, 11]. For example, a total of 234 species of bacteria and microscopic fungi were identified in the Mir environment, with bacteria consisting primarily of commensal human integuments, i.e., *Staphylococci*, *Micrococci* and *Coryneform* bacteria [12]. Extremophilic and extremotolerant bacteria were isolated in the spacecraft assembly and the test and launch preparation facilities [13]. Due to their proximity to spacefaring objects, these bacteria pose a considerable risk for forward contamination of extraterrestrial sites. Microbes can also affect the integrity of the spacecraft. Indeed, most of the fungal species found on structural materials are biodegraders of polymers [12].

Changes in cell growth characteristics during spaceflight were observed a long time ago for several microorganisms such as *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [14]. More recently, studies have demonstrated a key role for microgravity in microbial physiology, regulation of gene expression and pathogenesis [15, 16]. Bacteria can more readily proliferate in space, which suggests that this environment is better able to initiate growth that could lead to contamination, colonization and infection. Furthermore, it has been shown that the growth of several bacterial strains, including *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *S. aureus*, is enhanced by catecholamines [17-19], and elevations of catecholamines and cortisol/corticosterones in the plasma are frequently observed in individuals who have flown [20]. Thus, opportunities for microbes to establish foci of infection are enhanced, especially since space travel stimulates their growth and has a negative impact on immune function.

In vitro experiments conducted in the 1980's and 1990's indicated that greater concentrations of antibiotics were generally required to inhibit microbial growth in space [21]. Antibiotics were typically less effective against suspension cultures in space, but these traits appeared to be transient since attempts to reproduce the resistance after return to Earth have been unsuccessful [22, 23]. Various physiological, pharmacological and pharmacodynamic changes during spaceflight can affect drug efficacy *in vivo* [24]. For example, a reduction in the diversity of the bacterial flora in the gastrointestinal tract may give rise to an increase in the size of the drug resistance gene pool. It may also be facilitated by mutations induced by radiation. Indeed, high mutation frequencies in indicator genes carried by yeast have been reported after long-term spaceflight [25].

Direct evidence for a role of microgravity in microbial virulence has been provided by simulated microgravity experiments in which increased production of heat-labile *E. coli* enterotoxin were shown [26]. Recently, Altenburg et al. [27] demonstrated that the growth of

S. cerevisiae and *Candida albicans* is increased under simulated microgravity and results in a morphogenic switch that is consistent with enhanced pathogenicity. These data are in agreement with a previous observation indicating that *S. cerevisiae* retrieved from Apollo 16 were better able to survive in intradermal lesions of artificially infected mice than *S. cerevisiae* grown on Earth [28]. Nickerson's group performed several studies on the virulence of *Salmonella typhimurium* [29, 30]. They reported that *S. typhimurium* grown under spaceflight or simulated microgravity exhibited enhanced virulence, resistance to environmental stress and survival in macrophages [29]. Studies performed on hindlimb-unloaded mice, a model frequently used to simulate some aspects of spaceflight conditions, reached the same conclusion [26]. Recently, global microarray and proteomic analyses indicated that the expression of 167 transcripts and 73 proteins of *S. typhimurium* are changed under microgravity, with the conserved RNA-binding protein, Hfq, identified as a likely global regulator involved in the response to this environment [31]. Interestingly, it has been shown that this protein is also involved in the virulence of another pathogen, *Francisella tularensis* [32]. It is therefore evident that changes in gene expression that occur in microorganisms during spaceflight can increase their virulence.

Lymphoid organs and cell populations

Several independent pieces of work have shown that spaceflight conditions affect lymphoid organs. Durnova et al. [33] observed hypoplasia of lymphoid organs (spleen, lymph nodes and thymus) in rats that underwent a 22-day spaceflight. They demonstrated that spleen hypoplasia was due to a reduction in lymphocytes and erythroid cell numbers and that lymph node and thymus hypoplasia were due to a decrease in lymphocyte number. Similarly, Gridley et al. [34] noticed that after a 12-day space shuttle mission (STS-108), flown mice

had smaller spleen masses in comparison to animal enclosure and vivarium controls. These observations were confirmed by a recent study [35] showing that C57BL/6 mice from a 13-day space shuttle mission (STS-118) had lower spleen and thymus masses. However, the results in regards to the thymus mass appear to be more variable because the thymus mass has been reported to be decreased [33, 35, 36], increased [37, 38] or similar to controls in other studies [39-41].

Many studies reported variations in the peripheral blood leukocyte populations of astronauts and animals and in the lymphoid organs of animals after spaceflights. These modifications could be mediated by changes in adhesion molecules [42, 43] and the redistribution of body fluids in the microgravity environment [44]. Table 1 summarizes the data about leukocyte populations and shows a consistent increase in the number of neutrophils in the peripheral blood of humans and animals at the time of landing. The stress of landing could be responsible for this observation by mobilizing bone marrow PMNs into the circulation. Variable results were obtained for the other populations. Multiple reasons can explain these different results. First, markers used to quantify cells can differ between studies. For example, Gridley et al. [45] showed a decrease in B cell counts in spleens from C57BL/6 mice flown on STS-118, whereas another study [46] revealed an increase in B cell counts in spleens from C57BL/6 mice flown on STS-108. For STS-108 samples, B220 was used as marker to identify B cells, whereas CD19 was used to quantify B cells in STS-118 samples [45]. Since B220 is also found on natural killer (NK) cells, the increase in B220⁺ cells noted by Pecaute et al. [46] could be due to an increase in NK cells. On the other hand, Allebban et al. [47] and Ichiki et al. [48] observed a decrease in the number of peripheral blood B cells but no changes in spleen B cells from rats that were flown using IgG and OX33 as markers, respectively.

Another reason for these apparently contradictory results is that immunological changes are likely to depend on the duration of the spaceflight. For example, Stowe et al. [49] analyzed blood and urinary samples from astronauts who flew during 9 or 16 days (Table 1). Their study showed that the numbers of CD4⁺ T cells and monocytes in the peripheral blood were increased after the 9-day spaceflight, which was contrary to the 16-day spaceflight where CD4⁺ T cell numbers were unchanged and the monocyte numbers were lower. In parallel, they observed that the concentration of cortisol in the plasma was lower after the 9-day flight but increased after the 16-day flight. In contrast, the urinary epinephrine and norepinephrine levels were greater after the 9-day flight than after the 16-day flight, suggesting that sympathetic nervous system responses predominate after short spaceflights, while long flights are characterized by glucocorticoid-mediated changes, thus affecting the immune system differently. Another study revealed a correlation between increased epinephrine and norepinephrine levels and the number of white blood cells, monocytes and B cells in astronauts' peripheral blood samples collected after five 4- to 16-day space shuttle missions [50].

These differences may also be due to the fact that the number of flown individuals is reduced in some studies (see Table 1). Thus, individual variability can affect observations. For example, Chapes et al. [39] obtained different results when they studied 2 groups of 6 rats that flew for 8 days in the same animal enclosures. In particular, macrophage TNF- α secretion, blood cell distribution, bone structure and bone mass showed inconsistent changes. These differences may be attributable to individual variability but also to variations in the flight profiles. Although, the two missions were both 8-day flights, the launch and landing times were very different, and the animals were not dissected at the same time. One group was dissected in the evening and the other one at mid-morning. These times are close to the antithetical picks for daily circadian rhythms and could explain some differences between the

missions' results, especially for stress hormones whose production depends on circadian rhythms.

Finally, the choice of species with which to perform space experiments and the rearing conditions of the animals can also affect the results. Thus, there are many variables that complicate the analysis of spaceflight-induced modifications. Furthermore, these data indicate a high sensitivity of lymphoid organs and cell populations to differences in spaceflight conditions, as well as post-flight procedures, environment and experimental designs.

Innate immunity

The number, function and development of cells involved in innate immunity are affected by spaceflight. As shown in table 1, increases in the number of neutrophils were consistently observed after flights, which are likely due to the stress associated with landing, while the number of peripheral blood monocytes and NK cells were most often lower. Changes in function were observed in neutrophils, monocytes and NK cells. Neutrophil phagocytic and oxidative functions were affected by spaceflight [51, 52]. Astronauts' monocytes exhibited a reduced ability to engulf *E. coli*, elicit an oxidative burst and degranulate [52, 53]. Moreover, it was shown that their response to gram-negative endotoxins (LPS), which they could encounter during infection, was modulated by spaceflight-associated factors [54]. This alteration in the responsiveness of the crew's monocytes could be due to the decreased expression of CD14 and the increased expression of TLR4 because LPS responsiveness depends on the physical association of the LPS/CD14-TLR4-MD2 complex [55, 56]. Another possible explanation is provided by the observation that the levels of LPS binding protein were increased in astronauts' plasma. NK cell cytotoxicity and delay in hypersensitivity skin test responses to common recall antigens were also severely depressed

under spaceflight conditions [52, 57-62]. Decreased numbers of bone marrow-derived colony-forming units were reported for flown (CFU-monocytes and CFU-granulocytes) and hindlimb-unloaded rodents (CFU-M) [48, 63-65]. In a recent study, Ortega et al. [66] studied bone marrow cells from the humerus of C57BL/6 mice after a 13-day flight (STS-118) to determine how spaceflight affects the differentiation of cells of the granulocytic lineage. Their study indicated differences between bone marrow subpopulations, increased macrophage development in the bone marrow of flown mice and the activation of neutrophils in response to landing.

Changes in cytokine expression were observed in astronauts and flown animals, thereby providing another explanation for the weakening of natural immunity under spaceflight conditions. Of interest is the alteration of interferon (IFN) production, which is a first line of defense in the case of viral infection [67-69]. For example, decreased IFN secretion and low NK-cell activity were observed for lymphocytes isolated from the peripheral blood of cosmonauts after returning from a 7-day spaceflight [70]. In another study, splenocytes from rats flown for one week exhibited decreased IFN- γ production in response to Con A, which is a T cell mitogen [41]. Furthermore, exposure to the spaceflight environment can increase anti-inflammatory mechanisms, since LPS-activated splenocytes of mice that were flown on STS-118 produced more IL-6 and IL-10 and less TNF- α than control mice [35]. The same study showed that many of the genes responsible for scavenging reactive oxygen species (ROS) were up-regulated after the flight, suggesting that the cells attempted to scavenge ROS produced during spaceflight. Indeed, an increase in the superoxide response by murine polymorphonuclear neutrophils was reported even after short periods of microgravity [71].

Reactivation of herpes viruses was observed during spaceflight and has been used as an indicator of the immune status of astronauts [72-75]. Recently, the reactivation of the

varicella zoster virus (VZV) has been observed in the saliva of astronauts [76], suggesting an asymptomatic reactivation due to spaceflight-associated stresses. In another study, Mehta et al. [72] demonstrated that the reactivation of latent virus occurred in astronauts before the flight and that cytomegalovirus may further become reactivated during spaceflight. A decreased resistance to viruses has also been observed in hindlimb-unloaded mice. Indeed, Gould and Sonnenfeld [77] reported that female Swiss/Webster mice that are normally resistant to infection with the D variant of encephalomyocarditis virus, showed a marked increase in susceptibility to infection when suspended, while controls showed no increase in susceptibility to the virus. This correlated with a drop in IFN production. Elevated levels of stress hormones observed in astronauts and hindlimb-unloaded mice suggest that spaceflight- and hindlimb-induced stresses may be responsible of the reactivations of latent viruses [74, 75, 78-82]. Indeed, hormones such as catecholamine, which are released during stressful situations, regulate immune functions through adrenergic receptors located on immune cells, particularly β 2-type receptors [83-86]. Additionally, glucocorticoids, which are overproduced in response to stress, can alter innate and acquired immunity [20].

T cells in low gravity conditions

In the seventies, several investigators reported that lymphocytes from crewmembers on US and Soviet missions had decreased responses to mitogens at the time of landing [87]. Similar observations were reported in rats [88-90] and in mice [45]. Cogoli's group performed many studies to understand why the activation of human T lymphocytes is depressed under low gravity conditions. In their initial experiment, cultures of purified lymphocytes were activated in-flight with Con A, a T cell mitogen. Radioactive thymidine was added to the culture to evaluate the degree of activation. This experiment revealed that lymphocytes

exposed to microgravity showed almost no activation in comparison to lymphocytes activated on Earth [91]. This observation was confirmed by three separate experiments performed in Spacelab, SLS-1 and IML-2 [92-94]. Thus, there is a strong and consistent depression of T cell activation under space conditions.

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

The first possible explanation for the depression of T cell activation is that the binding of the mitogen is altered under low G conditions. To study the binding of Con A and the formation of patches and caps of Con A receptors, Cogoli's group performed experiments on sounding rockets. Fluorescent-labeled Con A was added to cells either as soon as low gravity conditions were established or a few minutes after the onset of microgravity. Two experiments were performed with lymphocytes purified from human peripheral blood [95] and one with the Jurkat T cell line [96]. All demonstrated that the influence of low gravity on the delivery of the first signal of activation is rather small and that rapid processes like mitogen binding, patching and probably capping are not involved in the depression of the *in vitro* activation of T lymphocytes [97].

An alteration in the IL-2/IL-2R function may be another cause of the depression in T cell activation because IL-2 drives T cell proliferation and differentiation into armed effector cells [98]. Experiments performed with human peripheral blood leukocytes (PBL) during

SLS-1 and IML-2 demonstrated that the secretion of IL-2 and the amount of IL-2R are strongly depressed under microgravity [93, 94]. An independent study confirmed that IL-2R is not expressed on the surface of cells activated in low gravity [99]. Recently, Gridley et al. [45] also noted that the IL-2 expression was decreased in mice that flew on STS-118. Moreover, when low gravity conditions were modeled in the random positioning machine, the genetic expression of IL-2 and IL-2R α were inhibited in Con A-activated cells [100, 101], while IL-2R β was not affected. These data demonstrate that the non-responsiveness of T lymphocytes under microgravity is due to a perturbation of the IL-2 and IL-2R gene expression and that low gravity differentially affects gene expression. The selective effect of microgravity on gene expression was confirmed by a study of early gene expression in PBL activated by Con A under microgravity [102].

The third signal needed for T lymphocyte activation is provided by IL-1 and by the contact between T cells and accessory cells. Flight studies have measured both reduced and normal levels of IL-1 for cells activated with Con A under microgravity [94, 103]. However, investigations performed under simulated microgravity supported the latest findings that IL-1 secretion is not adversely affected by microgravity [100, 104]. Cell to cell interactions and cell motility are important for cell communication and signal delivery. Cellular interactions occur under microgravity, since aggregates of human peripheral blood lymphocytes were observed in independent space experiments [91, 105]. Non-activated human peripheral blood lymphocytes are able to move under low gravity conditions [103], whereas lymphocytes cultivated at 1G show this capability only when they are activated or in the presence of a chemoattractant. Furthermore, the mean velocity of cells activated with Con A under microgravity was significantly higher than that of cells cultivated at 1G. On the contrary, Meloni et al. [106] found that the motility of J-111 monocytes is severely reduced in the random positioning machine. Significant changes in the cytoskeletal structure of these cells,

which plays an important role in cell motility [107], were also observed. Since T lymphocytes were found to be highly motile under microgravity, even in the absence of a mitogen, it can be argued that an impaired motility of human monocytes could hinder the delivery of the co-stimulatory signal to activate the B7/CD28 pathway, thereby providing a second explanation for the loss of T cell activation in space.

Inhibition of T cell proliferation could also result from alterations in the downstream signaling events [99]. PKA and PKC are key regulators of T cell activation [108]. The cytoskeleton is involved in signal transduction [107] and has been described as the structure through which cells sense gravity [109]. An association between the cytoskeleton and PKC exists [110]. A disorganization of the cytoskeleton [96, 106, 111-113] could therefore result in a disturbed localization of signaling molecules. This hypothesis was confirmed by the analysis of the distribution of PKC isoforms, which was shown to be altered in monocytes and lymphocytes exposed to low gravity [114-116]. However, a recent study indicated that the phosphorylation of PKC was not down-regulated in T cells incubated with Con A and anti-CD28 under microgravity [101]. Furthermore, although some studies suggested that there may be a microgravity-induced PKC defect [114, 117, 118], Cooper and Pellis [104] were able to fully activate T cells to proliferate under simulated microgravity with PMA (phorbol myristate acetate) and ionomycin, suggesting that it is the signaling pathways upstream of PKC activation that are sensitive to simulated microgravity. Hughes-Fulford's group analyzed differential gene expression in Con A and anti-CD28 activated human T cells [101] and discovered that the impaired induction of early genes regulated primarily by transcription factors NF- κ B, CREB, ELK, AP-1 and STAT1 contributes to T cell dysfunction under altered gravity. They also showed that the PKA pathway is down-regulated under microgravity. Since NF- κ B, AP-1 and CREB are all regulated by PKA, these findings indicate that PKA is a key player in gravity-mediated modulation of T cell activation. Since the absence of gravity has a

negative impact on signaling pathways essential for early T cell activation [108], it is not surprising that the expression of downstream targets such as genes involved in proliferation, apoptosis, biosynthesis and secretion, are affected by microgravity.

Cytokine data were recently reported for crewmembers on short- and long-duration missions on the ISS [119]. Both groups had a low secreted IFN- γ to IL-10 ratio on the day of landing after activation of peripheral blood T cells with anti-CD3 and anti-CD28. Another study performed on PHA-stimulated splenocytes of mice flown on STS-108 revealed that both IL-2 and IFN- γ were significantly lower after the flight [34]. IFN- γ depresses TH2 cell activity [120, 121], and a low IFN- γ to IL-10 ratio indicates a shift toward the TH2 subset [122]. Thus, a TH2 cytokine shift is associated with spaceflight. Another cytokine study reported that mice flown on STS-118 had a significantly higher IFN- γ to IL-10 ratio compared to control mice [45], suggesting a shift away from TH2 cells. However, cells other than TH1 and TH2 cells in the splenocyte mixture studied by these authors could have contributed to the levels for both cytokines. If a TH2 shift persists during long missions, it could represent a significant clinical risk for TH2-related autoimmune diseases, allergies, hypersensitivities and disease susceptibility related to diminished cell-mediated immunity.

Finally, we should not forget that space radiation affects T cells. For example, the thymuses from mice flown on STS-118 were used to evaluate the expression of cancer-related genes because thymic lymphoma is a common finding after radiation exposure [123]. The expression of 30 of the 84 evaluated genes involved in cell transformation and tumorigenesis were significantly modified shortly after return from the spaceflight environment [45].

Humoral immunity

By comparison to natural immunity and T cell responses, our knowledge of the spaceflight-induced alterations of the humoral immune system is less developed. Studies on the levels of immunoglobulin in the plasma did not reveal significant changes after short spaceflights [43, 52, 124]. Different results were reported after long-duration missions: Konstantinova et al. [125] reported increased levels of serum immunoglobulin, particularly total IgA and IgG, while Rykova et al. [52] indicated that the total amounts of serum IgA, IgG and IgM were unchanged after prolonged missions.

Studies on the effects of spaceflight on the antibody responses to specific antigens are rare. The only pieces of work addressing this question have been published recently [52, 126, 127]. In 2008, Rykova et al. [52] quantified IgM and IgG antibodies to herpes simplex virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and herpes virus type 6 in plasma samples from 30 cosmonauts who flew in the ISS to determine the effects of spaceflight on viral-specific humoral responses. No significant changes were found in the anti-viral antibody levels determined by ELISA after long and short spaceflights compared to the pre-launch values. Unfortunately, that study did not provide information about potential reactivation of these latent viruses in the analyzed individuals. To determine if the humoral response is affected by spaceflight conditions, our team performed the Genesis experiment during the Perseus space mission. Adult *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) remained in the Mir space station for five months and were immunized with protein. These are the only animals to have been immunized in space and are among the few vertebrates that have lived onboard a space station for an extended period of time. The quantification of IgY (the physiological counterpart of human IgA) [128] and IgM heavy chain mRNA in the spleen of animals sacrificed 10 days after landing showed that the IgY, but not the IgM, expression is increased in flown animals, which supports previous data published by Konstantinova et al. [125]. To better understand spaceflight-induced modifications of the humoral response, we determined how these animals

used their families of VH genes to build specific antibodies in response to the antigenic challenge. We focused our attention on IgM because this isotype represent 75% of the antibodies in *P. waltl* [128]. These studies indicated that genes belonging to the VHII and VHVI families encode variable domains of specific IgM heavy chains produced by immunized animals [126]. However, the VHII and VHVI families were found in 28% and 58% of IgM heavy chains from animals immunized on Earth and in 61% and 24% of IgM heavy chains from animals immunized onboard Mir, respectively. Then we determined how these animals used their individual VHII and VHVI genes. The experiments revealed an increase in the expression of IgM heavy chain mRNAs encoded by the VHII and VHVI.C genes and a strong decrease in IgM heavy chain mRNAs encoded by the VHVI.A and VHVI.B genes in spaceflight animals. Thus, different heavy chain mRNAs were expressed by spaceflight animals, demonstrating that this environment affects the humoral immune response [127].

ELISA tests performed under microgravity, 0.38 G (the Martian gravity), 1 G and 1.8 G indicated that antibody binding does not depend on gravity [129]. The same conclusion was reached when the linkage between Con A and the TCR was studied (see the T cell chapter). Thus, ligand-receptor interactions appear unaffected by spaceflight conditions and are not responsible for immune depression.

It should be noted that radiation encountered during space missions may also affect the humoral response, since significant decreases in IgG1, IgG2a and IgG2b in mice exposed to chronic low-dose gamma-irradiation have been reported [130]. Furthermore, it was shown that solar-equivalent proton radiation induced an acute and severe depression of B cells and specific antibody formation [131, 132].

Finally, a differential sensitivity of the cellular and humoral immune systems to spaceflight conditions seems to exist because it was shown that the cellular, but not the

humoral, responses are affected by short periods of time in-flight [43, 52, 124, 133]. Modifications of the humoral responses were only observed after long-term flights [125-127]. A spaceflight-induced modification in the expression of cytokines may contribute to this differential sensitivity. Indeed, as indicated in the paragraph about T cells, a TH2 cytokine shift is associated with spaceflights, and it has been demonstrated that if naïve CD4⁺ T cells react to type 1 signals, such as IFN- γ and IL-12, they differentiate into IFN- γ secreting TH1 cells to fight intracellular pathogens, or alternatively, in the presence of IL-4 they differentiate into TH2 cells whose main function is to promote humoral and anti-helminth immunity [134].

Countermeasures

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

Increased oxidative stress, which is harmful for cells and can induce many disorders, has been observed after radiation exposure and is associated with spaceflight [135, 136]. Indeed, it was shown that the urinary concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (a marker of oxidative damage to DNA) was higher and that red blood cell superoxide dismutase (an antioxidant enzyme) was lower after long-duration spaceflight [137]. Many molecules have antioxidant properties. Among these molecules, two investigations (one *in vitro* and one *in vivo*) showed that *N*-acetyl cysteine, ascorbic acid, α -lipoic acid, L-selenomethionine, co-enzyme Q10 and vitamin E succinate are effective in protecting against space radiation-induced oxidative stress, and a complete or nearly complete protection was achieved by treating cells or mice with a combination of these agents [138, 139]. The addition of D-selenomethionine in the food of rats also prevented the decrease in total antioxidants

associated with high-energy charged-particle irradiation by regulating the expression of genes involved in the repair of radiation-induced DNA damage [140]. These data indicate that antioxidants, alone or in combination, are likely promising countermeasures for protection against space radiation-induced adverse biologic effects.

During spaceflight crews have altered dietary intake [141]. In addition, nutrient absorption and metabolism appear altered under spaceflight conditions. A well known example is calcium metabolism. A decrease of up to 50% in calcium absorption and an increase of up to 50% of its excretion were observed in 3 crew members who spent 115 days onboard the Mir space station [142]. Since it is clearly established that energy and nutrient intake have profound effects on immune function [143], dietary countermeasures have been developed. Several studies have analyzed the effects of supplemental dietary nucleotides on immune function using ground-based models of microgravity. Hales et al. [144] have shown that decreased proliferation of splenocytes in response to PHA under simulated microgravity can be restored by supplementation with uridine, but not inosine, indicating that pyrimidines are more effective. This *in vitro* study also revealed that splenocytes secreted more IL-1 β , IL-2 and IFN- γ when cultured in the presence of a nucleoside-nucleotide mixture. *In vivo* studies confirmed these results by showing that RNA and uracil diets could restore IL-2 and IFN- γ production, in addition to the proliferation of PHA-stimulated splenocytes from hindlimb-unloaded mice [145, 146]. Thus, supplemental nucleotides, especially uracil/uridine, possess immunoprotective effects and enhance immune function; these supplements are potential countermeasures for the observed immune dysfunction associated with space travel.

Another interesting compound is AHCC, the active hexose-correlated compound. AHCC is an extract prepared from co-cultured mycelia of several species of *Basidiomycete* mushrooms that contain polysaccharides (74%), amino acids and minerals. This product has been shown to have a positive effect on the immune system of humans and rodents [147,

148]. Consequently, it was tested on hindlimb-unloaded mice that have decreased resistance to bacterial infections [19, 149]. Aviles et al. [149] showed that oral administration of AHCC for one week before suspension and throughout the 10-day suspension period enhanced the resistance to *K. pneumoniae* infection. The same team demonstrated that AHCC significantly increased the TH1 response in Con A-stimulated splenocytes from hindlimb-unloaded mice [150]. This compound also restored the functions of peritoneal cells that are suppressed by hindlimb-unloading and increased nitric oxide production in peritoneal cells isolated from hindlimb-unloaded mice. Other studies showed that AHCC enhanced resistance to infection in a mouse model of surgical wound infection and activated immune function to decrease the bacterial load in a murine model of intramuscular infection [151, 152]. Thus, it appears that AHCC restores innate immunity, which is greatly affected by hindlimb-unloading, and represents another countermeasure with great potential.

Other tested strategies include, for example, the injection of pegylated interleukin-2, a molecule that has been shown to increase both the absolute number and activity of NK cells, T cells and monocytes in humans and animals. However, studies performed on rats subjected to two eight-day spaceflights did not produce any reliable conclusions on the effects of this molecule because there were notable differences between some of the data obtained from each flight [39]. Recently, it has been shown that muscular exercise has a positive impact on antibody production. Indeed, Shearer et al. [153] reported that the rate of primary antibody production increased at a faster rate and to a higher level in women subjected to head-down bed-rest (HDBR) plus exercise than in ones subjected to HDBR-only or HDBR plus protein supplementation.

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

Conclusion

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

Authorship

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

Acknowledgments

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

References

1. Brumfiel, G. (2007) Space exploration: where 24 men have gone before. *Nature* **445**, 474-8.
2. Heppener, M. (2008) Spaceward ho! The future of humans in space. *EMBO Rep* **9 Suppl 1**, S4-12.
3. Pierson, D.L., Chidambaram, M., Heath, J.D., Mallery, L., Mishra, S.K., Sharma, B., Weinstock, G.M. (1996) Epidemiology of *Staphylococcus aureus* during space flight. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**, 273-81.
4. Pierson, D.L., Mehta, S.K., Magee, B.B., Mishra, S.K. (1995) Person-to-person transfer of *Candida albicans* in the spacecraft environment. *J Med Vet Mycol* **33**, 145-50.
5. Kimzey, S.L. (1977) Hematology and immunology studies. In *Biomedical Results from Skylab* (R. S. Johnson and L. F. Dietlein, eds), NASA, Washington, DC 248-282.
6. Ball, J.R., Evans Jr, C.H. (2001) Safe Passage: Astronaut Care for Exploration Missions. In *Committee on Creating a Vision for Space Medicine During Travel Beyond Earth Orbit, Board on Health Sciences Policy* National academy press, Washington DC.
7. Decelle, J.G., Taylor, G.R. (1976) Autoflora in the upper respiratory tract of Apollo astronauts. *Appl Environ Microbiol* **32**, 659-65.
8. Pierson, D.L. (2001) Microbial contamination of spacecraft. *Gravit Space Biol Bull* **14**, 1-6.
9. Ilyin, V.K. (2005) Microbiological status of cosmonauts during orbital spaceflights on Salyut and Mir orbital stations. *Acta Astronaut* **56**, 839-50.
10. Berry, C.A. (1970) Summary of medical experience in the Apollo 7 through 11 manned spaceflights. *Aerosp Med* **41**, 500-19.
11. Puleo, J.R., Oxborrow, G.S., Fields, N.D., Herring, C.M., Smith, L.S. (1973) Microbiological profiles of four Apollo spacecraft. *Appl Microbiol* **26**, 838-45.
12. Novikova, N.D. (2004) Review of the knowledge of microbial contamination of the Russian manned spacecraft. *Microb Ecol* **47**, 127-32.
13. La Duc, M.T., Dekas, A., Osman, S., Moissl, C., Newcombe, D., Venkateswaran, K. (2007) Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2600-11.
14. Taylor, G.R. (1974) Space microbiology. *Annu Rev Microbiol* **28**, 121-37.

15. Hammond, T.G., Benes, E., O'Reilly, K.C., Wolf, D.A., Linnehan, R.M., Taher, A., Kaysen, J.H., Allen, P.L., Goodwin, T.J. (2000) Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle. *Physiol Genomics* **3**, 163-73.
16. Collister, M., Didmon, M.P., MacIsaac, F., Stark, M.J., MacDonald, N.Q., Keyse, S.M. (2002) YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slr2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* **527**, 186-92.
17. Kinney, K.S., Austin, C.E., Morton, D.S., Sonnenfeld, G. (2000) Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacteria--mechanistic studies. *Life Sci* **67**, 3075-85.
18. Belay, T., Aviles, H., Vance, M., Fountain, K., Sonnenfeld, G. (2003) Catecholamines and in vitro growth of pathogenic bacteria: enhancement of growth varies greatly among bacterial species. *Life Sci* **73**, 1527-35.
19. Belay, T., Sonnenfeld, G. (2002) Differential effects of catecholamines on in vitro growth of pathogenic bacteria. *Life Sci* **71**, 447-56.
20. Sonnenfeld, G. (1999) Space flight, microgravity, stress, and immune responses. *Adv Space Res* **23**, 1945-53.
21. Leys, N.M., Hendrickx, L., De Boever, P., Baatout, S., Mergeay, M. (2004) Space flight effects on bacterial physiology. *J Biol Regul Homeost Agents* **18**, 193-9.
22. 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**, 41-7.
23. Tixador, R., Gasset, G., Eche, B., Moatti, N., Lapchine, L., Woldringh, C., Toorop, P., Moatti, J.P., Delmotte, F., Tap, G. (1994) Behavior of bacteria and antibiotics under space conditions. *Aviat Space Environ Med* **65**, 551-6.
24. Graebe, A., Schuck, E.L., Lensing, P., Putcha, L., Derendorf, H. (2004) Physiological, pharmacokinetic, and pharmacodynamic changes in space. *J Clin Pharmacol* **44**, 837-53.
25. Fukuda, T., Fukuda, K., Takahashi, A., Ohnishi, T., Nakano, T., Sato, M., Gunge, N. (2000) Analysis of deletion mutations of the *rpsL* gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* detected after long-term flight on the Russian space station Mir. *Mutat Res* **470**, 125-32.
26. Chopra, V., Fadl, A.A., Sha, J., Chopra, S., Galindo, C.L., Chopra, A.K. (2006) Alterations in the virulence potential of enteric pathogens and bacterial-host cell interactions under simulated microgravity conditions. *J Toxicol Environ Health A* **69**, 1345-70.

27. 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.
28. Luckey, T.D., Bengson, M.H., Kaplan, H. (1974) Effect of bioisolation and the intestinal flora of mice upon evaluation of an Apollo diet. *Aerosp Med* **45**, 509-18.
29. Nickerson, C.A., Ott, C.M., Mister, S.J., Morrow, B.J., Burns-Keliher, L., Pierson, D.L. (2000) Microgravity as a novel environmental signal affecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. *Infect Immun* **68**, 3147-52.
30. Wilson, J.W., Ramamurthy, R., Porwollik, S., McClelland, M., Hammond, T., Allen, P., Ott, C.M., Pierson, D.L., Nickerson, C.A. (2002) Microarray analysis identifies *Salmonella* genes belonging to the low-shear modeled microgravity regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13807-12.
31. Wilson, J.W., Ott, C.M., Honer zu Bentrup, K., Ramamurthy, R., Quick, L., Porwollik, S., Cheng, P., McClelland, M., Tsaprailis, G., Radabaugh, T., Hunt, A., Fernandez, D., Richter, E., Shah, M., Kilcoyne, M., Joshi, L., Nelman-Gonzalez, M., Hing, S., Parra, M., Dumars, P., Norwood, K., Bober, R., Devich, J., Ruggles, A., Goulart, C., Rupert, M., Stodieck, L., Stafford, P., Catella, L., Schurr, M.J., Buchanan, K., Morici, L., McCracken, J., Allen, P., Baker-Coleman, C., Hammond, T., Vogel, J., Nelson, R., Pierson, D.L., Stefanyshyn-Piper, H.M., Nickerson, C.A. (2007) Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16299-304.
32. Meibom, K.L., Forslund, A.L., Kuoppa, K., Alkhuder, K., Dubail, I., Dupuis, M., Forsberg, A., Charbit, A. (2009) Hfq, a novel pleiotropic regulator of virulence-associated genes in *Francisella tularensis*. *Infect Immun* **77**, 1866-80.
33. Durnova, G.N., Kaplansky, A.S., Portugalov, V.V. (1976) Effect of a 22-day space flight on the lymphoid organs of rats. *Aviat Space Environ Med* **47**, 588-91.
34. Gridley, D.S., Nelson, G.A., Peters, L.L., Kostenuik, P.J., Bateman, T.A., Morony, S., Stodieck, L.S., Lacey, D.L., Simske, S.J., Pecaut, M.J. (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. II. Activation, cytokines, erythrocytes, and platelets. *J Appl Physiol* **94**, 2095-103.
35. Baqai, F.P., Gridley, D.S., Slater, J.M., Luo-Owen, X., Stodieck, L.S., Ferguson, V.L., Chapes, S.K., Pecaut, M.J. (2009) Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *J Appl Physiol*.
36. Steffen, J.M., Musacchia, X.J. (1986) Thymic involution in the suspended rat: adrenal hypertrophy and glucocorticoid receptor content. *Aviat Space Environ Med* **57**, 162-7.
37. Pecaut, M.J., Simske, S.J., Fleshner, M. (2000) Spaceflight induces changes in splenocyte subpopulations: effectiveness of ground-based models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R2072-8.

38. Chapes, S.K., Simske, S.J., Forsman, A.D., Bateman, T.A., Zimmerman, R.J. (1999) Effects of space flight and IGF-1 on immune function. *Adv Space Res* **23**, 1955-64.
39. Chapes, S.K., Simske, S.J., Sonnenfeld, G., Miller, E.S., Zimmerman, R.J. (1999) Effects of spaceflight and PEG-IL-2 on rat physiological and immunological responses. *J Appl Physiol* **86**, 2065-76.
40. Congdon, C.C., Allebban, Z., Gibson, L.A., Kaplansky, A., Strickland, K.M., Jago, T.L., Johnson, D.L., Lange, R.D., Ichiki, A.T. (1996) Lymphatic tissue changes in rats flown on Spacelab Life Sciences-2. *J Appl Physiol* **81**, 172-7.
41. Gould, C.L., Lyte, M., Williams, J., Mandel, A.D., Sonnenfeld, G. (1987) Inhibited interferon-gamma but normal interleukin-3 production from rats flown on the space shuttle. *Aviat Space Environ Med* **58**, 983-6.
42. Grove, D.S., Pishak, S.A., Mastro, A.M. (1995) The effect of a 10-day space flight on the function, phenotype, and adhesion molecule expression of splenocytes and lymph node lymphocytes. *Exp Cell Res* **219**, 102-9.
43. Stowe, R.P., Sams, C.F., Mehta, S.K., Kaur, I., Jones, M.L., Feedback, D.L., Pierson, D.L. (1999) Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J Leukoc Biol* **65**, 179-86.
44. Vernikos, J. (1996) Human physiology in space. *Bioessays* **18**, 1029-37.
45. Gridley, D.S., Slater, J.M., Luo-Owen, X., Rizvi, A., Chapes, S.K., Stodieck, L.S., Ferguson, V.L., Pecaut, M.J. (2009) Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J Appl Physiol* **106**, 194-202.
46. Pecaut, M.J., Nelson, G.A., Peters, L.L., Kostenuik, P.J., Bateman, T.A., Morony, S., Stodieck, L.S., Lacey, D.L., Simske, S.J., Gridley, D.S. (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. I. Immune population distributions. *J Appl Physiol* **94**, 2085-94.
47. Allebban, Z., Ichiki, A.T., Gibson, L.A., Jones, J.B., Congdon, C.C., Lange, R.D. (1994) Effects of spaceflight on the number of rat peripheral blood leukocytes and lymphocyte subsets. *J Leukoc Biol* **55**, 209-13.
48. 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.
49. Stowe, R.P., Sams, C.F., Pierson, D.L. (2003) Effects of mission duration on neuroimmune responses in astronauts. *Aviat Space Environ Med* **74**, 1281-4.
50. Mills, P.J., Meck, J.V., Waters, W.W., D'Aunno, D., Ziegler, M.G. (2001) Peripheral leukocyte subpopulations and catecholamine levels in astronauts as a function of mission duration. *Psychosom Med* **63**, 886-90.

51. Kaur, I., Simons, E.R., Castro, V.A., Mark Ott, C., Pierson, D.L. (2004) Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain Behav Immun* **18**, 443-50.
52. Rykova, M.P., Antropova, E.N., Larina, I.M., Morukov, B.V. (2008) Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. *Acta Astronautica* **63**, 697-705.
53. Kaur, I., Simons, E.R., Castro, V.A., Ott, C.M., Pierson, D.L. (2005) Changes in monocyte functions of astronauts. *Brain Behav Immun* **19**, 547-54.
54. Kaur, I., Simons, E.R., Kapadia, A.S., Ott, C.M., Pierson, D.L. (2008) Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 1523-8.
55. Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Golenbock, D.T. (2004) Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect* **6**, 1361-7.
56. Miyake, K. (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* **12**, 186-92.
57. Rykova, M.P., Sonnenfeld, G., Lesnyak, A.T., Taylor, G.R., Meshkov, D.O., Mandel, A.D., Medvedev, A.E., Berry, W.D., Fuchs, B.B., Konstantinova, I.V. (1992) Effect of spaceflight on natural killer cell activity. *J Appl Physiol* **73**, 196S-200S.
58. Taylor, G.R., Janney, R.P. (1992) In vivo testing confirms a blunting of the human cell-mediated immune mechanism during space flight. *J Leukoc Biol* **51**, 129-32.
59. Lesnyak, A., Sonnenfeld, G., Avery, L., Konstantinova, I., Rykova, M., Meshkov, D., Orlova, T. (1996) Effect of SLS-2 spaceflight on immunologic parameters of rats. *J Appl Physiol* **81**, 178-82.
60. Konstantinova, I.V., Rykova, M., Meshkov, D., Peres, C., Husson, D., Schmitt, D.A. (1995) Natural killer cells after ALTAIR mission. *Acta Astronaut* **36**, 713-8.
61. Meshkov, D., Rykova, M. (1995) The natural cytotoxicity in cosmonauts on board space stations. *Acta Astronaut* **36**, 719-26.
62. Mehta, S.K., Kaur, I., Grimm, E.A., Smid, C., Feedback, D.L., Pierson, D.L. (2001) Decreased non-MHC-restricted (CD56+) killer cell cytotoxicity after spaceflight. *J Appl Physiol* **91**, 1814-8.
63. Sonnenfeld, G., Mandel, A.D., Konstantinova, I.V., Berry, W.D., Taylor, G.R., Lesnyak, A.T., Fuchs, B.B., Rakhmilevich, A.L. (1992) Spaceflight alters immune cell function and distribution. *J Appl Physiol* **73**, 191S-195S.
64. Armstrong, J.W., Kirby-Dobbels, K., Chapes, S.K. (1995) The effects of rM-CSF and rIL-6 therapy on immunosuppressed antiorthostatically suspended mice. *J Appl Physiol* **78**, 968-75.

65. 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**, 419-26.
66. Ortega, M.T., Pecaut, M.J., Gridley, D.S., Stodieck, L.S., Ferguson, V., Chapes, S.K. (2009) Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight. *J Appl Physiol* **106**, 548-55.
67. Crucian, B.E., Cubbage, M.L., Sams, C.F. (2000) Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. *J Interferon Cytokine Res* **20**, 547-56.
68. Sonnenfeld, G. (1994) Effect of space flight on cytokine production. *Acta Astronaut* **33**, 143-7.
69. Lesnyak, A.T., Sonnenfeld, G., Rykova, M.P., Meshkov, D.O., Mastro, A., Konstantinova, I. (1993) Immune changes in test animals during spaceflight. *J Leukoc Biol* **54**, 214-26.
70. Talas, M., Batkai, L., Stoger, I., Nagy, K., Hiros, L., Konstantinova, I., Rykova, M., Mozgovaya, I., Guseva, O., Kozharinov, V. (1984) Results of space experiment program "Interferon". *Acta Astronaut* **11**, 379-86.
71. Fleming, S.D., Edelman, L.S., Chapes, S.K. (1991) Effects of corticosterone and microgravity on inflammatory cell production of superoxide. *J Leukoc Biol* **50**, 69-76.
72. Mehta, S.K., Stowe, R.P., Feiveson, A.H., Tying, S.K., Pierson, D.L. (2000) Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. *J Infect Dis* **182**, 1761-4.
73. Stowe, R.P., Mehta, S.K., Ferrando, A.A., Feedback, D.L., Pierson, D.L. (2001) Immune responses and latent herpesvirus reactivation in spaceflight. *Aviat Space Environ Med* **72**, 884-91.
74. Stowe, R.P., Pierson, D.L., Barrett, A.D. (2001) Elevated stress hormone levels relate to Epstein-Barr virus reactivation in astronauts. *Psychosom Med* **63**, 891-5.
75. 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**, 235-42.
76. Cohrs, R.J., Mehta, S.K., Schmid, D.S., Gilden, D.H., Pierson, D.L. (2008) Asymptomatic reactivation and shed of infectious varicella zoster virus in astronauts. *J Med Virol* **80**, 1116-22.
77. Gould, C.L., Sonnenfeld, G. (1987) Enhancement of viral pathogenesis in mice maintained in an antiorthostatic suspension model: coordination with effects on interferon production. *J Biol Regul Homeost Agents* **1**, 33-6.

78. Aviles, H., Belay, T., Fountain, K., Vance, M., Sonnenfeld, G. (2003) Increased susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infection under hindlimb-unloading conditions. *J Appl Physiol* **95**, 73-80.
79. Aviles, H., Belay, T., Vance, M., Sonnenfeld, G. (2005) Effects of space flight conditions on the function of the immune system and catecholamine production simulated in a rodent model of hindlimb unloading. *Neuroimmunomodulation* **12**, 173-81.
80. O'Donnell, P.M., Orshal, J.M., Sen, D., Sonnenfeld, G., Aviles, H.O. (2009) Effects of exposure of mice to hindlimb unloading on leukocyte subsets and sympathetic nervous system activity. *Stress* **12**, 82-8.
81. Tipton, C.M., Greenleaf, J.E., Jackson, C.G. (1996) Neuroendocrine and immune system responses with spaceflights. *Med Sci Sports Exerc* **28**, 988-98.
82. Meehan, R., Whitson, P., Sams, C. (1993) The role of psychoneuroendocrine factors on spaceflight-induced immunological alterations. *J Leukoc Biol* **54**, 236-44.
83. Abrass, C.K., O'Connor, S.W., Scarpace, P.J., Abrass, I.B. (1985) Characterization of the beta-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J Immunol* **135**, 1338-41.
84. Liggett, S.B. (1989) Identification and characterization of a homogeneous population of beta 2-adrenergic receptors on human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* **139**, 552-5.
85. Miura, T., Kudo, T., Matsuki, A., Sekikawa, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Nakane, A. (2001) Effect of 6-hydroxydopamine on host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* **69**, 7234-41.
86. Boomersshine, C.S., Lafuse, W.P., Zwilling, B.S. (1999) Beta2-adrenergic receptor stimulation inhibits nitric oxide generation by *Mycobacterium avium* infected macrophages. *J Neuroimmunol* **101**, 68-75.
87. Konstantinova, I.V., Antropova, Y.N., Legenkov, V.I., Zazhirey, V.D. (1973) Study of the reactivity of blood lymphoid cells in crew members of the Soyuz-6,7 and 8 spaceships before and after flight. *Space Biol Aerosp Med* **7**, 48-55.
88. Nash, P.V., Mastro, A.M. (1992) Variable lymphocyte responses in rats after space flight. *Exp Cell Res* **202**, 125-31.
89. Chapes, S.K. (2004) Lessons from Immune 1-3: what did we learn and what do we need to do in the future? *J Gravit Physiol* **11**, P45-8.
90. Sonnenfeld, G., Foster, M., Morton, D., Bailliard, F., Fowler, N.A., Hakenewerth, A.M., Bates, R., Miller, E.S., Jr. (1998) Spaceflight and development of immune responses. *J Appl Physiol* **85**, 1429-33.

91. Cogoli, A., Tschopp, A., Fuchs-Bislin, P. (1984) Cell sensitivity to gravity. *Science* **225**, 228-30.
92. Bechler, B., Cogoli, A., Mesland, D. (1986) [Lymphocytes are sensitive to gravity]. *Naturwissenschaften* **73**, 400-3.
93. Cogoli, A., Bechler, B., Cogoli-Greuter, M., Criswell, S.B., Joller, H., Joller, P., Hunzinger, E., Muller, O. (1993) Mitogenic signal transduction in T lymphocytes in microgravity. *J Leukoc Biol* **53**, 569-75.
94. Pippia, P., Sciola, L., Cogoli-Greuter, M., Meloni, M.A., Spano, A., Cogoli, A. (1996) Activation signals of T lymphocytes in microgravity. *J Biotechnol* **47**, 215-22.
95. Cogoli, M., Bechler, B., Cogoli, A., Arena, N., Barni, S., Pippia, P., Sechi, G., Valora, N., Monti, R. (1992) Lymphocytes on sounding rockets. *Adv Space Res* **12**, 141-4.
96. Cogoli-Greuter, M., Spano, A., Sciola, L., Pippia, P., Cogoli, A. (1998) Influence of microgravity on mitogen binding, motility and cytoskeleton patterns of T lymphocytes and jurkat cells-experiments on sounding rockets. *Japanese Journal of Aerospace and Environmental Medicine* **35**, 27-39.
97. Cogoli-Greuter, M., Lovis, P., Vadrucchi, S. (2004) Signal transduction in T cells: an overview. *J Gravit Physiol* **11**, P53-6.
98. Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., Taniguchi, T. (1993) The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* **11**, 245-68.
99. Hashemi, B.B., Penkala, J.E., Vens, C., Huls, H., Cubbage, M., Sams, C.F. (1999) T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and in spaceflight. *FASEB J* **13**, 2071-82.
100. Walther, I., Pippia, P., Meloni, M.A., Turrini, F., Mannu, F., Cogoli, A. (1998) Simulated microgravity inhibits the genetic expression of interleukin-2 and its receptor in mitogen-activated T lymphocytes. *FEBS Lett* **436**, 115-8.
101. 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**, 2020-2.
102. Negri, R., Costanzo, G., Galleri, G., Meloni, M.A., Pippia, P., Schopper, T., Cogoli-Greuter, M. (2003) Early transcriptional response of human T-lymphocytes to microgravity conditions during MASER 9 vector flight. In *Proceedings of the 16th ESA Symposium on European Rocket and Ballon Programmes and related Research* (B. Warmbein, ed) ESA SP-530, St. Gallen, Switzerland 243-247.
103. Cogoli, A. (1993) The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system. *J Leukoc Biol* **54**, 259-68.

104. Cooper, D., Pellis, N.R. (1998) Suppressed PHA activation of T lymphocytes in simulated microgravity is restored by direct activation of protein kinase C. *J Leukoc Biol* **63**, 550-62.
105. Cogoli-Greuter, M., Meloni, M.A., Sciola, L., Spano, A., Pippia, P., Monaco, G., Cogoli, A. (1996) Movements and interactions of leukocytes in microgravity. *J Biotechnol* **47**, 279-87.
106. Meloni, M.A., Galleri, G., Pippia, P., Cogoli-Greuter, M. (2006) Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modelled low gravity. *Protoplasma* **229**, 243-9.
107. Janmey, P.A. (1998) The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* **78**, 763-81.
108. Hughes-Fulford, M., Sugano, E., Schopper, T., Li, C.F., Boonyaratanakornkit, J.B., Cogoli, A. (2005) Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits. *Cell Signal* **17**, 1111-24.
109. Ingber, D. (1999) How cells (might) sense microgravity. *FASEB J* **13 Suppl**, S3-15.
110. Gregorio, C.C., Repasky, E.A., Fowler, V.M., Black, J.D. (1994) Dynamic properties of ankyrin in T lymphocytes: colocalization with spectrin and protein kinase C beta. *J Cell Biol* **125**, 345-58.
111. 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**, 1007-18.
112. 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**, 1783-5.
113. Hughes-Fulford, M. (2003) Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. *Adv Space Res* **32**, 1585-93.
114. Schmitt, D.A., Hatton, J.P., Emond, C., Chaput, D., Paris, H., Levade, T., Cazenave, J.P., Schaffar, L. (1996) The distribution of protein kinase C in human leukocytes is altered in microgravity. *FASEB J* **10**, 1627-34.
115. Hatton, J.P., Gaubert, F., Lewis, M.L., Darsel, Y., Ohlmann, P., Cazenave, J.P., Schmitt, D. (1999) The kinetics of translocation and cellular quantity of protein kinase C in human leukocytes are modified during spaceflight. *FASEB J* **13 Suppl**, S23-33.
116. Hatton, J.P., Gaubert, F., Cazenave, J.P., Schmitt, D. (2002) Microgravity modifies protein kinase C isoform translocation in the human monocytic cell line U937 and human peripheral blood T-cells. *J Cell Biochem* **87**, 39-50.
117. de Groot, R.P., Rijken, P.J., den Hertog, J., Boonstra, J., Verkleij, A.J., de Laat, S.W., Kruijer, W. (1991) Nuclear responses to protein kinase C signal transduction are sensitive to gravity changes. *Exp Cell Res* **197**, 87-90.

118. Limouse, M., Manie, S., Konstantinova, I., Ferrua, B., Schaffar, L. (1991) Inhibition of phorbol ester-induced cell activation in microgravity. *Exp Cell Res* **197**, 82-6.
119. Crucian, B.E., Stowe, R.P., Pierson, D.L., Sams, C.F. (2008) Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med* **79**, 835-43.
120. Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**, 163-89.
121. Young, H.A., Bream, J.H. (2007) IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. *Curr Top Microbiol Immunol* **316**, 97-117.
122. Zhu, J., Paul, W.E. (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557-69.
123. Boulton, E., Cleary, H., Plumb, M. (2002) Myeloid, B and T lymphoid and mixed lineage thymic lymphomas in the irradiated mouse. *Carcinogenesis* **23**, 1079-85.
124. Voss, E.W., Jr. (1984) Prolonged weightlessness and humoral immunity. *Science* **225**, 214-5.
125. Konstantinova, I.V., Rykova, M.P., Lesnyak, A.T., Antropova, E.A. (1993) Immune changes during long-duration missions. *J Leukoc Biol* **54**, 189-201.
126. Boxio, R., Dournon, C., Frippiat, J.P. (2005) Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J Appl Physiol* **98**, 905-10.
127. Bascove, M., Huin-Schohn, C., Gueguinou, N., Tschirhart, E., Frippiat, J.P. (2009) Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J.* **23**, 1607-15.
128. Schaerlinger, B., Bascove, M., Frippiat, J.P. (2008) A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. *Mol Immunol* **45**, 776-86.
129. Maule, J., Fogel, M., Steele, A., Wainwright, N., Pierson, D.L., McKay, D.S. (2003) Antibody binding in altered gravity: implications for immunosorbent assay during space flight. *J Gravit Physiol* **10**, 47-55.
130. Courtade, M., Caratero, A., Jozan, S., Pipy, B., Caratero, C. (2001) Influence of continuous, very low-dose gamma-irradiation on the mouse immune system. *Int J Radiat Biol* **77**, 587-92.
131. Kajioka, E.H., Gheorghe, C., Andres, M.L., Abell, G.A., Folz-Holbeck, J., Slater, J.M., Nelson, G.A., Gridley, D.S. (1999) Effects of proton and gamma radiation on lymphocyte populations and acute response to antigen. *In Vivo* **13**, 525-33.

132. Kajioka, E.H., Andres, M.L., Li, J., Mao, X.W., Moyers, M.F., Nelson, G.A., Slater, J.M., Gridley, D.S. (2000) Acute effects of whole-body proton irradiation on the immune system of the mouse. *Radiat Res* **153**, 587-94.
133. Sonnenfeld, G., Butel, J.S., Shearer, W.T. (2003) Effects of the space flight environment on the immune system. *Rev Environ Health* **18**, 1-17.
134. Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-93.
135. Stein, T.P., Leskiw, M.J. (2000) Oxidant damage during and after spaceflight. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E375-82.
136. Wan, X.S., Bloch, P., Ware, J.H., Zhou, Z., Donahue, J.J., Guan, J., Stewart, J., Kennedy, A.R. (2005) Detection of oxidative stress induced by low- and high-linear energy transfer radiation in cultured human epithelial cells. *Radiat Res* **163**, 364-8.
137. Smith, S.M., Zwart, S.R. (2008) Nutrition issues for space exploration. *Acta Astronautica* **63**, 609-613.
138. Wan, X.S., Ware, J.H., Zhou, Z., Donahue, J.J., Guan, J., Kennedy, A.R. (2006) Protection against radiation-induced oxidative stress in cultured human epithelial cells by treatment with antioxidant agents. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **64**, 1475-81.
139. Kennedy, A.R., Guan, J., Ware, J.H. (2007) Countermeasures against space radiation induced oxidative stress in mice. *Radiat Environ Biophys* **46**, 201-3.
140. Kennedy, A.R., Ware, J.H., Guan, J., Donahue, J.J., Biaglow, J.E., Zhou, Z., Stewart, J., Vazquez, M., Wan, X.S. (2004) Selenomethionine protects against adverse biological effects induced by space radiation. *Free Radic Biol Med* **36**, 259-66.
141. Lane, H.W., Gretebeck, R.J., Smith, S.M. (1998) Nutrition, endocrinology, and body composition during space flight. *Nutr Res* **18**, 1923-34.
142. Smith, S.M., Wastney, M.E., Morukov, B.V., Larina, I.M., Nyquist, L.E., Abrams, S.A., Taran, E.N., Shih, C.Y., Nillen, J.L., Davis-Street, J.E., Rice, B.L., Lane, H.W. (1999) Calcium metabolism before, during, and after a 3-mo spaceflight: kinetic and biochemical changes. *Am J Physiol* **277**, R1-10.
143. Field, C.J., Johnson, I.R., Schley, P.D. (2002) Nutrients and their role in host resistance to infection. *J Leukoc Biol* **71**, 16-32.
144. Hales, N.W., Yamauchi, K., Alicea, A., Sundaresan, A., Pellis, N.R., Kulkarni, A.D. (2002) A countermeasure to ameliorate immune dysfunction in in vitro simulated microgravity environment: role of cellula nucleotide nutrition. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **38**, 213-7.
145. Kulkarni, A.D., Yamauchi, K., Hales, N.W., Ramesh, V., Ramesh, G.T., Sundaresan, A., Andrassy, R.J., Pellis, N.R. (2002) Nutrition beyond nutrition: plausibility of immunotrophic nutrition for space travel. *Clin Nutr* **21**, 231-8.

146. Yamauchi, K., Hales, N.W., Robinson, S.M., Niehoff, M.L., Ramesh, V., Pellis, N.R., Kulkarni, A.D. (2002) Dietary nucleotides prevent decrease in cellular immunity in ground-based microgravity analog. *J Appl Physiol* **93**, 161-6.
147. Matsui, Y., Uhara, J., Satoi, S., Kaibori, M., Yamada, H., Kitade, H., Imamura, A., Takai, S., Kawaguchi, Y., Kwon, A.H., Kamiyama, Y. (2002) Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study. *J Hepatol* **37**, 78-86.
148. Wakame, K. (1999) Protective effects of active hexose correlated compound (AHCC) on the onset of diabetes induced by streptozotocin in the rat. *Biomedical Research* **20**, 145-152.
149. Aviles, H., Belay, T., Fountain, K., Vance, M., Sun, B., Sonnenfeld, G. (2003) Active hexose correlated compound enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* infection in mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. *J Appl Physiol* **95**, 491-6.
150. Aviles, H., Belay, T., Vance, M., Sun, B., Sonnenfeld, G. (2004) Active hexose correlated compound enhances the immune function of mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. *J Appl Physiol* **97**, 1437-44.
151. Aviles, H., O'Donnell, P., Sun, B., Sonnenfeld, G. (2006) Active hexose correlated compound (AHCC) enhances resistance to infection in a mouse model of surgical wound infection. *Surg Infect (Larchmt)* **7**, 527-35.
152. Aviles, H., O'Donnell, P., Orshal, J., Fujii, H., Sun, B., Sonnenfeld, G. (2008) Active hexose correlated compound activates immune function to decrease bacterial load in a murine model of intramuscular infection. *Am J Surg* **195**, 537-45.
153. Shearer, W.T., Ochs, H.D., Lee, B.N., Cohen, E.N., Reuben, J.M., Cheng, I., Thompson, B., Butel, J.S., Blancher, A., Abbal, M., Aviles, H., Sonnenfeld, G. (2009) Immune responses in adult female volunteers during the bed-rest model of spaceflight: antibodies and cytokines. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 900-5.
154. Taylor, G.R., Neale, L.S., Dardano, J.R. (1986) Immunological analyses of U.S. Space Shuttle crewmembers. *Aviat Space Environ Med* **57**, 213-7.
155. White, R.J. (1998) Weightlessness and the human body. *Sci Am* **279**, 58-63.

Figure Legends

Fig. 1.

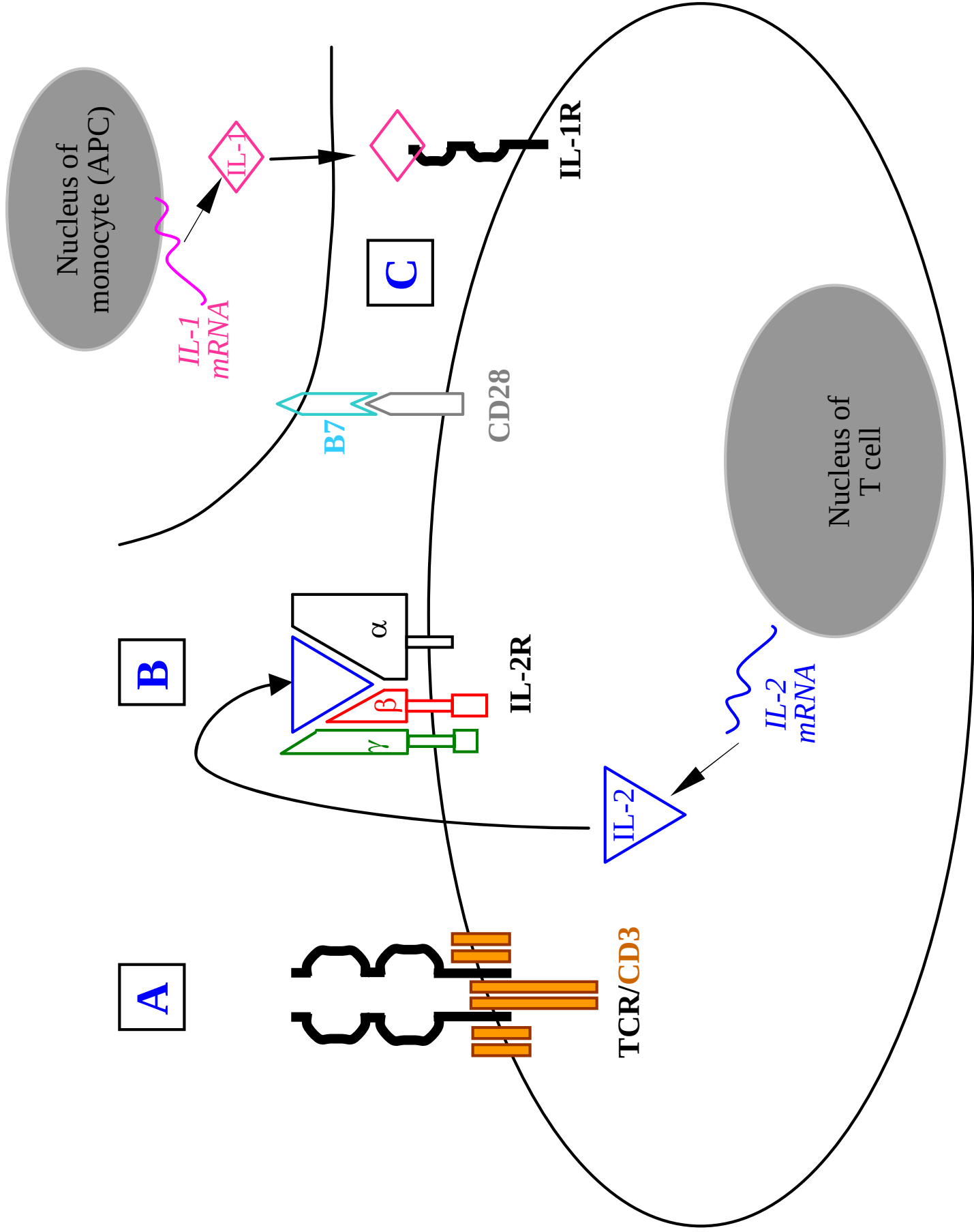
Spaceflight-induced alterations in the organism.

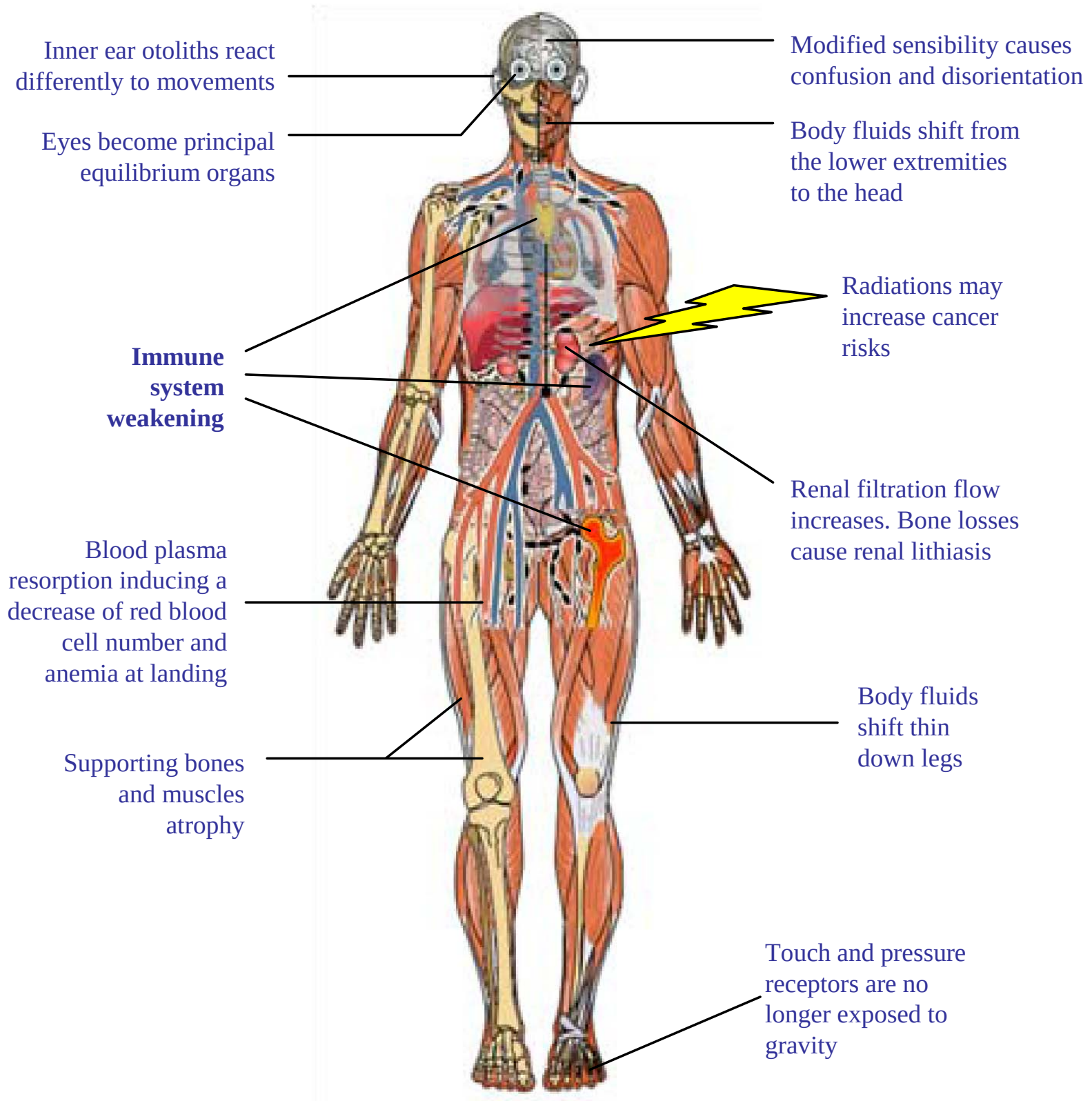
During space missions, many factors combine to influence a variety of physiological functions. This schematic representation of the human body provides an overview of the most important of those functions. Adapted from White, 1998 [155].

Fig. 2.

Signals required for full T cell activation.

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





VI. Objectifs

Bien que le pleurodèle soit un modèle animal qui a été utilisé avec succès lors de plusieurs missions spatiales, peu d'informations concernant ses anticorps étaient disponibles lorsque j'ai commencé mon doctorat. Durant ma thèse j'ai donc participé à la caractérisation des isotypes d'anticorps produits par cet animal afin de mieux comprendre les modifications de sa réponse immunitaire humorale induites lors de l'expérience Genesis ; les pleurodèles de l'expérience Genesis étant à ce jour les seuls animaux à avoir été immunisés dans l'espace.

Par ailleurs, les résultats précédemment obtenus par le groupe montrent un changement d'expression des familles VHII et VHVI utilisées pour fabriquer les chaînes lourdes d'IgM lors de l'expérience Genesis. L'un des buts de ma thèse a donc été de mieux caractériser ces modifications. Pour ce faire, j'ai étudié l'expression de chacun des gènes appartenant aux familles VHII et VHVI chez les animaux immunisés sur Terre et dans la station Mir.

Enfin, j'avais également pour mission de caractériser le principal effecteur des hypermutations somatiques, à savoir AID et d'étudier l'effet d'un séjour dans l'espace sur les hypermutations somatiques et donc la maturation de l'affinité des anticorps. Ce dernier point complète ainsi l'étude des paratopes des anticorps produits lorsque des animaux sont immunisés dans l'espace.

RESULTATS

Partie 1 : Caractérisation des isotypes d'anticorps produits par *P. waltl*.

I. Introduction

Comme indiqué dans l'introduction de ce mémoire, au cours des dernières années trois nouveaux isotypes d'anticorps ont été découverts dans différentes espèces de poissons osseux et deux chez les amphibiens anoures [159, 162-164, 171]. Les poissons osseux et les amphibiens anoures produisent donc 5 isotypes différents comme les mammifères. Dans ce contexte, il est surprenant que les amphibiens urodèles n'en produisent que deux : les IgM et les IgY. Au début de ma thèse j'ai donc participé à la recherche et la caractérisation tous les isotypes produits par l'urodèle *Pleurodeles waltl*.

II. Isotypes produits par le pleurodèle

Ne disposant d'aucune information génétique sur les anticorps produits par le pleurodèle, nous avons défini un couple d'amorces dégénérées afin d'amplifier un morceau de gène VH de cet amphibien. Ce morceau de gène VH nous a permis de définir un oligonucléotide spécifique, VHGPS1, pour amplifier par PCR RACE 3' toutes les régions constantes des chaînes lourdes des anticorps de *P. waltl*. Les produits de PCR obtenus, longs de 1,8 kb, ont été clonés pour créer une mini banque ne contenant que des ADNc partiels codant les parties constantes des chaînes lourdes des anticorps de *P. waltl*. Cinquante clones de cette mini banque ont été choisis au hasard et leurs ADN plasmidiques ont été digérés par *HpaII*. Trois profils de restriction différents ont été observés et trois clones par profil ont été séquencés. Les séquences obtenues montrent que deux profils correspondent à l'isotype IgM et le troisième à l'isotype IgY (Figure 1, publication 2).

Pour déterminer si *P. waltl* ne produit que ces deux isotypes, nous avons criblé toute la mini banque avec des sondes spécifiques des régions constantes des IgM et des IgY. Douze clones n'hybridant pas aux deux sondes et contenant un insert supérieur à 0,5 kb ont été mis en évidence et séquencés. Parmi les douze séquences obtenues, 3 correspondent à un nouvel isotype que nous avons dénommé IgP (P pour *pleurodèle*) (Figure 2, publication 2).

Les trois ADNc partiels codant les IgP sont composés de quatre domaines constants suivis d'une queue sécrétoire. Par PCR RACE 3', nous avons pu isoler les domaines transmembranaires des IgM et des IgP mais pas des IgY. Cependant, la présence d'un site

d'épissage dans le domaine Cv4 de *P. waltl* suggère que les lymphocytes B de cet amphibien doivent être capables de générer des IgY membranaires [274].

Certains anticorps étant préférentiellement exprimés au niveau des muqueuses, nous avons également créé une mini banque d'ADNc partiels de chaînes lourdes d'anticorps à partir d'ARN d'intestin de pleurodèle. Cependant, le criblage de cette banque n'a pas permis de mettre en évidence des isotypes supplémentaires.

Par Northern blotting, nous avons recherché des transcrits de chaînes lourdes d'anticorps de différentes tailles qui pourraient correspondre à d'autres isotypes (Figure 3, publication 2). Cette expérience a révélé que tous les transcrits de chaînes lourdes d'anticorps de *P. waltl* ont la même taille et sont donc composés de quatre domaines constants. Aucun transcrit codant un isotype à deux ou trois domaines constants n'a été mis en évidence.

Enfin, nous avons démontré par Southern blotting que les régions constantes des trois isotypes du pleurodèle sont codées par des gènes uniques comme c'est le cas chez de nombreux autres vertébrés.

En conclusion, nos travaux démontrent pour la première fois que le pleurodèle produit trois isotypes d'anticorps. Ceux-ci sont composés de quatre domaines constants, peuvent être sécrétés ou membranaires et possèdent toutes les caractéristiques attendues pour un anticorps, à savoir : les cystéines responsables des ponts disulfures intra-domaine, les cystéines responsables de la liaison des chaînes lourdes entre-elles et les cystéines responsables de la liaison des chaînes lourdes avec les chaînes légères. Enfin, les IgM de *P. waltl* sont très probablement des polymères, comme chez la majorité des vertébrés, car elles possèdent une cystéine en position 92 dans C μ 3 qui pourrait être impliquée dans la polymérisation des molécules d'IgM. De plus, le motif PX₃NXS/TL/VX₄E/DX₄CY, requis pour la polymérisation, est présent dans la partie sécrétoire des IgM de *P. waltl* [275, 276].

III. Les IgP sont spécifiques au genre *Pleurodeles*

Nous avons recherché la présence d'IgP dans d'autres espèces d'amphibiens. Pour cela, nous avons tiré parti du séquençage du génome de *X. tropicalis* et de la création de banques d'EST (Expressed Sequence Tag) pour les urodèles *A. mexicanum* et *A. t. tigrinum*. Aucune séquence homologue aux domaines constants des IgP n'ayant pu être mise en évidence dans ces banques et dans le génome de *X. tropicalis*, nous avons construit une mini banque d'ADNc partiels de chaînes lourdes d'anticorps à partir d'ARN de rate d'*A. mexicanum*. Cette banque a été criblée avec des sondes spécifiques des domaines constants des chaînes lourdes

des IgM et des IgY d'*A. mexicanum*. Les clones n'hybridant pas aux deux sondes utilisées ont été séquencés mais aucune chaîne lourde d'IgP n'a pu être mise en évidence. Finalement, nous avons réalisé des PCR sur l'ADN génomique d'*A. mexicanum* pour essayer d'amplifier un exon du gène codant les domaines constants des IgP mais à nouveau cette recherche fut infructueuse. Les IgP ne semblent donc pas présentes chez les amphibiens anoures, ni chez les *Ambystomatidae*. Ceci pourrait être dû au fait que les urodèles et les anoures ont divergé il y a 270 millions d'années et qu'*A. mexicanum* et *P. waltl* appartiennent à des familles différentes d'urodèles. De plus, le genre *Pleurodeles* ne comprend que deux espèces : *P. waltl* et *P. poireti*.

IV. Origine possible des IgP

Pour étudier la relation pouvant exister entre les IgP et les autres isotypes, nous avons construit des arbres phylogénétiques à partir des deux premiers domaines constants ou des deux derniers domaines constants de différentes chaînes lourdes d'immunoglobuline (Figure 4, publication 2). Ces arbres montrent que les domaines CH1 et CH2 des IgP se rapprochent des domaines CH1 et CH2 des IgX et des IgY d'amphibiens ainsi que des domaines CH1 et CH2 des IgA d'oiseaux. Par contre, les domaines CH3 et CH4 des IgP sont différents des deux derniers domaines CH de tous les autres isotypes. Récemment, il a été montré que les IgA d'oiseaux, les IgX de xénope et les IgA du gecko léopard auraient été produits par recombinaison entre les gènes C μ et C ν : CH1 et CH2 provenant de C ν , CH3 et CH4 provenant de C μ [277]. De la même façon, on pourrait imaginer que les IgP soient le résultat d'un événement de recombinaison entre le gène C ν et un gène codant un autre isotype qui est encore inconnu et qui n'est plus exprimé puisqu'on ne le trouve pas dans nos mini banques d'ADNc d'anticorps. L'opposé est également envisageable. Le gène C ν pourrait dériver du gène C π via un processus de recombinaison. Enfin, une autre possibilité serait que les gènes C ν et C π auraient été générés par duplication et que les deux derniers exons CH auraient divergé au cours du temps. Nos connaissances actuelles ne nous permettent pas de choisir entre ces hypothèses.

V. Expression des isotypes de *P. waltl*

L'équipe a précédemment démontré que les premiers transcrits de chaînes lourdes d'IgM sont présents 6,5 jours après la fécondation des œufs de *P. waltl* [184]. Nous avons maintenant étudié, par RT-PCR, l'expression des IgP et des IgY au cours du développement

du pleurodèle (Figure 5, publication 2). Cette figure montre que les premiers transcrits d'IgP sont détectables 33 jours après la fécondation des œufs. Une augmentation de leur expression est observée 17 jours plus tard. Les IgY, quant à elles, ne sont détectées qu'à partir de 100 jours après la fécondation. A ce stade, elles sont présentes dans le foie, la peau et les poumons (Figure 6A, publication 2). Les IgY apparaissent dans la rate 2 mois après la métamorphose (Figure 7, publication 2). Une très faible expression des IgY dans l'intestin est alors détectable. Celle-ci augmente ensuite très fortement pour atteindre sa valeur maximale un mois plus tard. Les lymphocytes B producteurs d'IgY prolifèrent donc dans l'intestin du pleurodèle au cours du troisième mois après la métamorphose. Ces données montrent également que les lymphocytes B producteurs d'IgY colonisent progressivement différents tissus au cours du développement de cet amphibien et que la distribution de ces lymphocytes dans les tissus de *P. waltl* est fixée 3 mois après la métamorphose. De plus, les résultats des RT-PCR semi-quantitatives (Figure 7, publication 2) montrent que, chez l'adulte, les IgY représentent 35% des anticorps présents dans l'intestin contre seulement 15% des anticorps présents dans la rate. Cette prépondérance des IgY dans l'intestin par rapport à la rate, ainsi que l'expression des IgY dans les poumons et la peau du pleurodèle, indiquent que les IgY pourraient avoir la même fonction que les IgA des mammifères et les IgX du xénope.

Nous avons également remarqué que les IgP ne sont exprimés que dans la rate (Figure 6, publication 2). Ils représentent 27% des transcrits d'anticorps avant la métamorphose et seulement 10% des transcrits d'anticorps deux mois après la métamorphose (Figure 7, publication 2). Il est intéressant de noter que les lymphocytes B producteurs d'IgY apparaissent dans la rate à ce moment. Il semble donc que les cellules productrices d'IgP soient remplacées par des cellules productrices d'IgY dans la rate de *P. waltl* lors de la métamorphose. De la même façon, il a été démontré que la métamorphose du xénope s'accompagne d'un changement de lymphocytes B et donc de répertoire d'anticorps [278].

La figure 7 montre également que les IgP, avec les IgM, assurent la protection des larves de pleurodèle.

VI. Diversité des chaînes lourdes d'IgM et d'IgP

Nous avons séquencé 34 réarrangements VHDJH associés à C μ et 44 réarrangements VHDJH associés à C π provenant de la rate d'une larve de pleurodèle âgée de 100 jours. Six sous-groupes VH, parmi les 10 existants chez le pleurodèle, ainsi que 8 segments JH et 8 segments DH ont été observés dans ces 78 ADNc. Dix ADNc de chaînes lourdes d'IgM présentent un réarrangement VHJH, c'est-à-dire sans segment DH. La figure 8 de la

publication 2 indique comment les différents segments géniques sont utilisés pour construire les réarrangements associés à $C\mu$ et à $C\pi$. Nous voyons que le sous-groupe VHII est préférentiellement utilisé dans les chaînes lourdes d'IgM alors que c'est le sous-groupe VHVI dans les IgP. Nous remarquons également que deux segments DH (DH7 et DH8) et un segment JH (JH8) sont trouvés dans les chaînes lourdes d'IgP mais pas dans celles d'IgM. Enfin, il faut remarquer que 6 DH et 7 JH sont utilisés pour former les chaînes lourdes d'IgM alors que seulement 4 DH et 4 JH sont utilisés pour construire les CDR3 des chaînes lourdes des IgP. De plus, il n'y a pas de réarrangement sans DH dans cet isotype. Ces deux dernières observations indiquent que la diversité des régions CDR3 est plus faible chez les IgP. Cette constatation est confirmée par notre étude des associations VHDJH faisant intervenir des gènes des sous-groupes VHII et VHVI (Table 2, publication 2). En effet, nous observons 12 associations différentes impliquant un gène VHII et 5 impliquant un gène VHVI dans les ADNc de chaînes lourdes d'IgM alors que seulement 3 associations différentes impliquant de tels gènes sont trouvées dans les IgP.

De plus, le fait que les associations VHDJH sont différentes dans les transcrits de chaînes lourdes d'IgM et d'IgP suggère qu'il n'y a pas de commutation de classe chez les urodèles comme cela a été précédemment suggéré par Golub et Charlemagne [180] chez l'axolotl. L'absence de commutation de classe implique qu'un lymphocyte B exprime toujours le même isotype au cours de sa vie et donc qu'il y a trois populations distinctes de lymphocytes B chez le pleurodèle : une produisant les IgM, une produisant les IgY et enfin une fabriquant les IgP.

Comment les IgM, IgP et IgY sont-ils produits s'il n'y a pas de commutation de classe? Deux hypothèses sont possibles :

1- Soit les gènes des chaînes lourdes de *P. waltl* sont organisés en translocon (figure 19A et B) comme chez les mammifères, les oiseaux, les reptiles, le poisson zèbre et les autres amphibiens. Dans ce cas, les différents isotypes pourraient être produits par épissage alternatif d'un long transcrit comme c'est le cas pour les IgM et les IgD chez l'homme et la souris ;

2- Soit les gènes des chaînes lourdes de *P. waltl* sont organisés comme chez le coelacanthé (figure 19 C) ou en cluster comme chez les poissons cartilagineux (figure 19D) où chaque chaîne lourde est codée sur un locus différent. Dans cette configuration il n'y a pas de réarrangement entre les gènes et segments appartenant à différents clusters et donc pas de commutation de classe.

VII. Similitudes entre les cellules productrices d'IgP et les cellules B1 des mammifères

Chez l'homme, les cellules B1 sont 3,5 fois plus abondantes dans le répertoire B des nouveau-nés que dans celui des adultes [279]. De plus, il a été montré que les anticorps produits par les cellules B1 utilisent une partie restreinte du répertoire VH [280]. Similairement, les IgP sont quatre fois plus abondantes avant la métamorphose, présentent une diversité plus faible que les IgM et jouent très probablement un rôle protecteur important pour les larves de pleurodèle qui vivent dans l'eau et ne disposent donc pas de la protection dont bénéficie un fœtus de mammifère.

Publication 2 (*Molecular immunology*, 2008)

A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae ¹.

Bérénice Schaerlinger, Matthieu Bascove and Jean-Pol Frippiat*

Laboratoire de Biologie Expérimentale et Immunologie, EA 3442, Université Henri Poincaré-Nancy 1. Boulevard des Aiguillettes, BP 239. F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France.

¹The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL nucleotide sequence database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) and have been assigned the accession numbers **AJ575799**, **AJ575800**, **AM295004**, **AM410552** and **AM419754**.

*Corresponding author: J.-P. FRIPPIAT, EA 3442, Université Henri Poincaré-Nancy 1. Boulevard des Aiguillettes, BP 239. F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France.

Tel: +33 3 83684494. Fax: +33 3 83684196. E-mail: Jean-Pol.Frippiat@scbiol.uhp-nancy.fr

Abstract

Up to now, it was thought that urodele amphibians possessed only two IgH isotypes, IgM (μ) and IgY (ν). By screening a *Pleurodeles waltl* Ig cDNA mini-library, we identified three isotypes: IgM, IgY and a previously unknown class. IgM are multimeric molecules and represent the most abundant isotype throughout the life of *P. waltl*. IgY are likely the counterpart of mammalian IgA. The new isotype has typical Ig H-chain characteristics and is expressed as both secretory and membrane forms. Our analyses indicate that this isotype is restricted to *Pleurodeles*. Consequently, we named it “IgP” (π) for *Pleurodeles*. This isotype is mainly expressed after hatching. Its expression decreases after metamorphosis. Our data indicate that IgP-expressing B cells present some similarities with mammalian B1-cells.

Keywords: Comparative immunology/evolution, antibodies, B cells, amphibian.

Introduction

The humoral immune system of gnathostome vertebrates is characterized by the production of immunoglobulins (Ig) in response to antigens. Antibodies are made of heavy and light chains composed of a single variable domain followed by one or several constant domains. The nature of the constant regions of Ig heavy chains determines the function of the isotype. Mammals produce five Ig isotypes: IgM, IgG, IgA, IgE and IgD. IgM is well conserved through evolution. Different antibody isotypes exist in non-mammalian vertebrates. Three isotypes, IgM, IgNAR and IgW, have been described in cartilaginous fish and lungfish and five, IgM, IgD, IgH, IgT and IgZ, in bony fish.

IgNAR and IgW are specific to cartilaginous fish and are composed of long chains with six C-regions. IgW is orthologous to *Xenopus* IgD (Ohta and Flajnik, 2006). IgNAR are dimers of heavy chains lacking light chains bound (Roux et al., 1998). Similarly, camels and llamas functional antibodies, solely composed of heavy chains, have been reported (Hamers-Casterman et al., 1993). Up to now, the role of IgNAR has not been well established.

Bony fish IgD are very complex as there is a considerable variation in the number of exons and repeat patterns of C δ exons in different teleosts (Hirono et al., 2003; Hordvik et al., 1999; Saha et al., 2004; Srisapoomee et al., 2004; Stenvik and Jorgensen, 2000; Wilson et al., 1997). Moreover, it was shown in various fishes that IgD is transcribed as a chimeric molecule with the first C μ exon spliced to C δ 1. Like IgD in mammals, the fish IgD function is not clear. IgT and IgZ heavy chains are both composed of four C-regions and are highly homologous. In adult zebrafish, IgZ is limited to the primary lymphoid tissue, whereas IgT is expressed in a variety of trout tissues, suggesting functional differences between the IgT and IgZ isotypes (Hansen et al., 2005). IgZ-expressing B cells could have a protective function during early developmental stages of zebrafish (Danilova et al., 2005) but the function of IgT

has not been established. Compared to IgZ and IgT, fugu IgH has major structural differences (Savan et al., 2005). Indeed, its heavy chains are composed by only two C-regions. IgH has likely a gut-associated lymphoid tissue (GALT)-like function.

Anuran amphibians can express five isotypes of immunoglobulin: IgM, IgY, IgX and the recently identified IgD and IgF. *Xenopus* IgY is the functional homologue of mammalian IgG but its heavy chains have four C-domains. From an evolutionary point of view, IgY is regarded as a precursor of both IgE and IgG (Warr et al., 1995). IgX are composed of four C-domains and are the physiological counterpart of IgA because a large number of IgX-expressing B cells are located in the gut epithelium (Mussmann et al., 1996). Recently, Ohta and Flajnik (2006) have described the *X. tropicalis* IgD isotype that possess eight C-domains. IgD seems therefore present in the ancestor of all living jawed vertebrates. Finally, IgF heavy chains have two C-domains and the gene contains a hinge exon making it the earliest example in evolution of an Ig isotype with a separately encoded genetic hinge (Zhao et al., 2006).

The Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*, is the model in which the most molecular information about the urodele immune system has been gathered. This amphibian has two distinct populations of B cells that synthesize IgM and IgY antibodies (Fellah and Charlemagne, 1988). *A. mexicanum* IgY molecules are found in the intestinal mucosa and could therefore be the physiological counterpart of mammalian IgA (Fellah et al., 1992).

It was surprising that the diversity of urodele (salamanders and newts) heavy chain isotypes was less than the one of fishes and anurans. We reinvestigated this issue in the Iberian ribbed newt *Pleurodeles waltl* that unlike *A. mexicanum* undergoes metamorphosis. In this manuscript we demonstrate that *P. waltl* produces three isotypes: IgM, IgY and a new class of immunoglobulin designated IgP. Our data suggest that IgP-producing B cells could be the functional counterpart of mammalian B1-cells. Moreover, there is likely a B-cells renewal during the metamorphosis of this urodele.

Materials and Methods

Animals, DNA, and RNA extraction

P. waltl and *A. mexicanum* were reared in running tap water at 18°C. Animals were treated in accordance with the National Legislation and the Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes 86/609/EEC. Genomic DNA was extracted from the livers of three adult *P. waltl* according to Ghanem et al. (1988). Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen). Poly A⁺ RNA was prepared using the FastTrack mRNA isolation 2.0 kit (Invitrogen).

Construction and screening of the Ig cDNA mini-libraries

We used the Smart Race cDNA amplification kit (Clontech), total RNA extracted from the spleen of adult *P. waltl* and the VH-specific primer VHGSP1 (Table 1) to amplify by 3'-RACE the constant regions of *P. waltl* Ig heavy chains. PCR products were cloned in the pGEM-T Easy vector (Promega) to generate a cDNA mini-library containing the constant domains of *P. waltl* Ig heavy chains. In the same way, two other Ig cDNA mini-libraries were constructed, the first one using *P. waltl* intestine poly A⁺ RNA and the second using *A. mexicanum* spleen RNA and the JHAXO primer (Table 1). Plasmid DNA from 50 clones of the *P. waltl* spleen mini-library was digested with *HpaII*. Three restriction profiles were observed. Inserts of three clones per profiles were sequenced and revealed the *P. waltl* IgM and IgY constant domains. *P. waltl* C_μ- and C_γ-specific probes were produced by PCR using the CU3+CU4 or CY3+CY4 primers (Table 1), labelled using the DIG DNA labelling and detection kit (Roche applied science) and used to screen the *P. waltl* spleen and intestine

mini-libraries. Clones carrying an insert and that did not hybridize to the IgM or IgY probe were sequenced. The *A. mexicanum* mini-library was also analyzed by colony hybridization with *A. mexicanum* IgM- and IgY-specific probes obtained by PCR using the IGMAXO1+IGMAXO2 or IGYAXO1+IGYAXO2 primers (Table 1).

Phylogenetic trees

Unrooted phylogenetic trees have been constructed by neighbour joining using the MEGA3 software and the following sequences: IgA (duck [U27222](#), human [J00220](#)); IgD (salmon [AF278717](#), catfish [AF363448](#), human [K02879](#), *X. tropicalis* [DQ387453](#)); IgE (human [J00222](#), opossum [AF035194](#)); IgF (*X. tropicalis* [DQ350887](#)); IgG (human IgG1 [J00228](#), mouse IgG3 [G3MSC](#)); IgH (fugu [AB217620](#)); IgM (longnose gar [U12455](#), bowfin [U12456](#), sturgeon [Y13253](#), trout [X83372](#), ladyfish [M26182](#), catfish [M27230](#), carp [AB004105](#), zebrafish [AY643753](#), axolotl [X68700](#), *Pleurodeles* [AJ575799](#), *X. laevis* [J03631](#), little skate [M29679](#), nurse shark [M92851](#), horn shark [XD7784](#), opossum [AF012109](#), mouse [J00443](#), human [X14940](#), chicken [X01613](#), marbled lungfish [AF437724](#)); IgP (*Pleurodeles* [AM295004](#)); IgT (trout [AAW66981](#)); IgW/NARC/NAR (sandbar shark IgW [U40560](#), nurse shark IgNARC [U51450](#), nurse shark IgNAR [U18701](#)); IgX (*X. laevis* [X13779](#)); IgY (*X. laevis* [X15114](#), axolotl [X69492](#), *Pleurodeles* [AJ575800](#)); IgZ (salmon [CB513580](#) and [CB516716](#), trout [AY773715](#) and [BX876157](#), carp [CA964701](#), zebrafish [AY643752](#)).

Southern blotting

Sixty-five µg of genomic DNA digested with *Bam*HI, *Kpn*II or *Pst*II were fractionated in 0.8% agarose and transferred to Hybond N⁺ nylon membranes (Amersham Biosciences).

Hybridization to [α - 32 P]dCTP labelled C μ -, C ν - and C π -specific probes, and high-stringency wash conditions were performed as described by Ghanem et al. (1988). C μ , C ν and C π probes were obtained by PCR using primers CU1+CU5, CY1+CY5 or CP2+CP3 (Table 1). These three probes are located in the CH1 domain of each isotype. Signals were detected using a Phosphorimager (Typhoon 9410, Amersham) after one night of exposure.

Northern blotting

Poly A⁺ RNA was extracted from the mixture of the spleens of four 2-year-old *P. waltl* (2 males and 2 females) and from the mixture of the intestines of one male and one female of the same age. Two μ g of poly A⁺ RNA were used to perform these experiments. Membranes were hybridized to a mixture of 6 VH-specific probes, to GAPDH- and C μ - or C ν - or C π -specific probes. Numbers of cpm in GAPDH hybridizing bands were used to normalize the amounts of RNA loaded in the wells. Probes were obtained by PCR using the VHs1-6+VHr1-6, CU1+CU2, CY1+CY2, CP4+CP5 or GAPDH1+GAPDH2 primers (Table 1) and labelled with [α - 32 P]dCTP. Filters were washed at high stringency. Signals were quantified using a Phosphorimager (Typhoon 9410, Amersham) after one or three days of exposure.

Semi-quantitative RT-PCR on P. waltl spleen and intestine RNA

Total RNA (2 μ g) was reverse transcribed using random hexamers and MMLV-reverse transcriptase (Invitrogen). Using C μ - (CU3+CU4), C ν - (CY3+CY4), C π - (CP4+CP5) and GAPDH-specific (GAPDH1+GAPDH2) primers (Table 1), we first determined the exponential range of the PCR reactions with 200 ng of cDNA and Goldstar Taq DNA polymerase (Eurogentec). Primers were defined in different C-domains to ensure that

genomic DNA could not be amplified. Signals were quantified using Geldoc 2000 and the Quantity One v.4.3.1 software (Biorad). GAPDH signals were used to normalize the amount of RNA engaged in the reactions. The total amount of Ig transcripts in each tissue was determined by adding the values of the signals obtained with the $C\mu$ -, $C\delta$ - and $C\pi$ -specific primers. The signal obtained for each isotype was divided by the total amount of Ig RNA in the corresponding tissue to determine the contribution of each isotype to the Ab production in each tissue. Experiments were performed at least three times with 25 cycles of amplification for the GAPDH-specific primers or 31 cycles of amplification for the Ig-specific primers. Negative controls were done without cDNA or with spleen RNA. No amplification product was obtained. PCR products were sequenced to verify the specificity of the amplifications. Statistical significance was assessed by ANOVA analyses followed by the post hoc test of Newmann-Keuls with a threshold lower than 5%.

Construction of VH $C\mu$ and VH $C\pi$ libraries

We amplified by 5'-RACE the VDJ rearrangements of IgM and IgP heavy chain transcripts using spleen RNA from a 100-day-old larva, the Smart Race cDNA kit (Clontech), and the CU6 or CP2 primer which anneals to the *P. waltl* $C\mu 1$ or $C\pi 1$ domain (the first constant domain of IgM or IgP heavy chains), respectively (Table 1). PCR products of 0.6 kb containing the VDJ rearrangements associated to $C\mu$ or to $C\pi$ were cloned in the pGEM-T Easy vector to produce either a VH $C\mu$ or a VH $C\pi$ library. Thirty-four μ and 44 π clones were randomly chosen and sequenced to evaluate how VH, DH and JH segments are used to build μ and π heavy chains.

Results

Determination of the P. waltl antibody repertoire

Alignment of VH sequences from various species allowed the definition of two degenerated primers, VHA and VHB (Table 1). Using these primers, a 146 bp fragment of a *P. waltl* VH gene has been amplified from *P. waltl* genomic DNA. The sequence of this PCR product was aligned with sequences of VH genes from different species to define a gene-specific primer, VHGPS1, in the most conserved region of the 146 bp PCR product. Primer VHGPS1 was used to perform 3'-RACE on spleen cDNA. PCR products of 1.8 kb, containing the different constant regions of the Ig heavy chains, were obtained and cloned to produce a *P. waltl* Ig cDNA mini-library. Plasmids DNA of fifty randomly chosen clones were digested with *HpaII*. Three restriction profiles were observed. Inserts of three clones per profile were sequenced and revealed the *P. waltl* IgM and IgY isotypes (Fig. 1).

To determine whether μ and ν were the only isotypes expressed by *P. waltl*, we screened the entire spleen Ig cDNA mini-library (291 clones) with *P. waltl* C μ - and C ν -specific probes. Two hundred and thirty nine clones hybridized to the C μ -specific probe and 4 to the C ν -specific probe. Amongst the 48 double negative clones, 36 contained small PCR products (0.5 kb) and were not further analyzed. Twelve double negative clones contained a 1.8 kb PCR product and were sequenced. Five sequences corresponded to pieces of unspliced heavy chain transcripts without a CH region, four sequences were aberrant PCR products, and 3 sequences corresponded to a new Ig isotype designated IgP (Fig. 2). These three partial cDNA are composed of four C-domains ending in a C-terminal secretory tail. Using spleen cDNA as template and the CU7, CP1 and CY6 primers (Table 1), we performed 3'-RACE experiments to identify the membrane form of IgM, IgP and IgY (Fig. 1 and 2). The IgM and

IgP membrane regions are composed of an acid-rich extracellular domain followed by a transmembrane region and a short positively charged cytoplasmic tail. The mRNA coding for a transmembrane form of IgY could not be isolated.

Because some antibodies are preferentially associated to mucosa, an Ig cDNA mini-library prepared from *P. waltl* intestine polyA⁺ RNA was constructed and analyzed by colony hybridization with the C μ - and C ν -specific probes. Four double negative clones containing a 1.8 kb PCR product were identified and sequenced but did not contain Ig transcripts.

Finally, we performed northern blotting experiments on spleen and intestine poly A⁺ RNA. One membrane was hybridized to a mixture of 6 VH families-specific probes to look for bands of different sizes which could be candidates for another isotype (Fig. 3). This experiment revealed a single band in the spleen of *P. waltl* of the same size than the IgM and IgY heavy chain mRNAs thereby suggesting that all Ig heavy chains have the same size.

Global structure and phylogenetic position of P. waltl IgM, IgP and IgY

The N-terminal extremity of the *P. waltl* C μ 1, C π 1 and C ν 1 domains (the first constant domains of the IgM, IgP and IgY heavy chains, respectively) were defined as the first amino acid following the JH segment. The number of CH domains in each isotype, and the boundaries between them were determined by comparison with other Ig amino acid sequences (Fig. 1 and 2). *A. mexicanum* and *P. waltl* IgM and IgY are closely related since they present 64% and 51% of identity, respectively (Fig. 4). Moreover, our tree indicates that amphibian IgM molecules are more related to avian than to fish IgM.

To analyze the relationship of *P. waltl* π to other Ig, we constructed phylogenetic trees with the translated sequences of the 2 first C-exons or the 2 last C-exons of different Ig heavy chains (Fig. 4). These trees indicate that the C π 1 and C π 2 domains cluster with the C ν 1 and

C α 2 domains of amphibians and the two first CH domains of bird IgA and *Xenopus* IgX (Fig. 4A) while the C π 3 and C π 4 domains define an independent branch (Fig. 4B). Trees were also built using sequences from individual CH1, CH2 and CH4 domains and provided similar results (data not shown).

IgP in other amphibians

To determine whether the IgP isotype exists in other amphibians, we used the *P. waltl* IgP sequence to perform tBlastN searches of the *X. tropicalis* genome assembly version 4.1 (www.jgi.doe.gov), and of the *A. mexicanum* and *A. t. tigrinum* EST databases (www.ambystoma.org). The highest homologies were observed with the IgY sequence of *X. tropicalis*, the lambda light chain constant region of *A. mexicanum* and the IgM C region of *A. t. tigrinum*. We have also constructed and analyzed an Ig cDNA mini-library made from *A. mexicanum* spleen RNA but we could not identify an IgP homologue. Consequently, to our knowledge, IgP doesn't seem to be present in anuran and *Ambystomatidae* amphibians. This is likely due to the fact that urodeles and anurans diverged some 270 Myr ago. Moreover, *A. mexicanum* and *P. waltl* belong to different families of urodele and the genus *Pleurodeles* comprises only two species: *P. waltl* and *P. poireti*.

IgM, IgP and IgY are coded by single genes

The genome of *P. waltl* is about ten times larger than the human genome. This size seems to be due to repetitive DNA and not polyploidy. Therefore, we wondered whether each Ig isotype could be coded by several copies of each gene. To answer this question, we performed Southern blotting experiments with *P. waltl* liver genomic DNA digested either by

*Bam*HI, *Kpn*I or *Pst*I. We hybridized the membranes at high stringency with probes specific of the C μ 1, C π 1 or C δ 1 domains (data not shown). Each probe revealed only one band with each enzyme thereby demonstrating that each isotype is coded by a single copy gene.

Expression of IgP and IgY during P. waltl development

We previously showed that the earliest *P. waltl* IgM expression was detected 6.5 days after fertilization (Frippiat et al., 2001). By RT-PCR, we studied the expression of IgP and IgY during early stages of *P. waltl* development (Fig. 5). IgP is first detected 33 days after fertilization, its expression increases 17 days later. IgY heavy chains were not detected until 100 days after fertilization (Fig. 6A). At that stage, IgM is expressed in the intestine, liver, lungs, skin, spleen and thymus; IgY is detected in the liver, lungs and skin, while IgP is restricted to the spleen.

Figure 7 shows the relative proportion of each Ig isotype in the spleen and the intestine of *P. waltl* at various stages of its life. The earliest IgY expression in the spleen of *P. waltl* was detected and quantified 2 months after metamorphosis (Fig. 7A). At this stage, IgY transcripts are detected in the intestine but at very low levels that could not be quantified (Fig. 7B). Then, its expression increases rapidly and reaches the maximum one month later indicating that IgY-producing B cells expand very quickly in the intestine during the third month after metamorphosis. Taken together, these data indicate that the tissue-specific pattern of expression of IgY changes during *P. waltl* development. Indeed, IgY transcripts are found in the liver, lungs and skin during larval development (Fig. 6A), in the spleen 2 months after metamorphosis and the intestine few weeks later (Fig. 7). In adults, IgY mRNA are found in the intestine, liver, lungs, skin and spleen (Fig. 6B). Thus, the adult tissue distribution of IgY is fixed 3 months after metamorphosis.

IgP heavy chain transcripts were only detected in the spleen of larvae and adults (Fig. 6). Our semi-quantitative RT-PCR experiments (Fig. 7) indicated that before metamorphosis IgP represent 27% of the total amount of Ig mRNA in the spleen. Two months after metamorphosis, the proportion of IgP mRNA is three-folds lower in this tissue. Interestingly, the expression of IgY begins at this stage suggesting that IgP-producing B cells are replaced by IgY-producing B cells during the metamorphosis of *P. waltl*.

P. waltl IgY expression

Previous studies indicated that *A. mexicanum* and *X. laevis* IgY seem to have different physiological functions. Indeed, while *X. laevis* IgY seems to be the physiological counterpart of mammalian IgG (Hadji-Azimi, 1979; Mussmann et al., 1996), it is believed that *A. mexicanum* IgY are physiologically related to mammalian IgA because they are expressed in the intestine (Fellah et al., 1992).

By northern blotting (Fig. 3), we determined that IgM and IgY transcripts represent, respectively, 93% and 7% of the Ig mRNA in the spleen of adults. No Ig heavy chain transcripts could be detected in the intestine even after 3 days of exposure likely because these molecules are less abundant in gut than in spleen mRNA. Consequently, we used semi-quantitative RT-PCR to quantify Ig isotypes in these tissues (Fig. 7). These experiments showed that IgY transcripts represent 35% and 15% of the total amount of Ig mRNA in the intestine and spleen of adults, respectively. Moreover, we also detected IgY heavy chain transcripts in the lungs and the skin (Fig. 6). Taken together, these data suggest that IgY of *P. waltl* could be the physiological counterpart of *A. mexicanum* IgY and mammalian IgA.

VH, DH and JH usage in IgM and IgP heavy chains before metamorphosis

We determined the sequences of heavy-chain V regions in cDNAs from the spleen of a 100-day-old larva (34 μ and 44 π clones randomly chosen in the VH C μ and VH C π libraries were sequenced). Six VH families were identified in these cDNAs out of the 10 VH families that *P. waltl* possess (J.-P.F., unpublished data). Alignment of the cDNAs allowed the identification of 8 JH segments. The number of genomic DH sequences is unknown but 8 DH regions were estimated from the common sequence motifs of CDR3 in independent VH regions. Any junction having one stretch of at least six nucleotides identical to a portion of a DH core sequence was considered to use this segment. For 7 cDNA out of 78, we were not able to assign a D segment because D core sequences were missing. Ten μ cDNA have 0-3 nt between the VH and JH segments indicating a direct VH-JH joining. Figure 8 presents the VH, DH and JH usage in *P. waltl* expressed μ and π . Figure 8A indicates that family VHII is preferentially used in IgM H-chains while it is family VHVI in IgP H-chains. Figure 8B indicates that 2 DH (VII and VIII) and one JH (VIII) are found in IgP but not in IgM heavy chains. It also shows that only 4 DH and 4 JH are used to build the CDR3 regions of IgP heavy chains while 6 DH and 7 JH are found in μ cDNAs. Moreover, no direct VH-JH joining was found in π cDNAs.

We also studied the VDJ associations involving VHII and VHVI genes in these cDNAs (Table 2). Interestingly, we found 12 different associations involving a VHII gene and 5 involving a VHVI gene in μ cDNAs while only 3 different associations involving such genes were observed in π cDNAs. These data show that less potential combinatorial diversity exist in π than in μ heavy chains.

Discussion

P. waltl IgM, IgP and IgY have classical Ig structures

The *P. waltl* C μ , C π and C υ cDNAs derive from single copy genes and consist in four constant domains. On the contrary to what is observed in other species, no Ig cDNA composed of 2 or 3 constant domains were found despite intensive search. The mRNA for secretory and membrane-bound forms of IgM and IgP have been isolated. The presence of a splicing site in the C υ 4 domain of *A. mexicanum* and *P. waltl* (data not shown) suggests that urodele B cells could generate υ -membrane mRNA (Rogers et al., 1980). The analysis of the amino-acid sequences deduced from the IgM, IgP and IgY H-chains shows that each C-domain contains the two canonical cysteines that form the intra-chain disulfide bridges (Fig. 1 and 2). Conserved Trp residues are located 14-15 positions after the first Cys and 7-8 positions before the second Cys residue. C π 4 does not possess the second Trp residue which is also absent in zebrafish and carp IgZ sequences (Danilova et al., 2005). Cys 10 at the beginning of C μ 1, C υ 1 and C π 1 (the first C-domains of IgM, IgY and IgP H-chains) is conserved and could allow the association of heavy and light chains. Each isotype possess two other Cys in their CH2 domains (Fig. 1 and 2) which are likely involved in inter-heavy chain disulfide bridges. In addition, extra inter-domain bounds could exist in IgP and IgY heavy chains as in avian C υ (Parvari et al., 1988).

Finally, *P. waltl* IgM are likely multimeric because the amino-acid sequence deduced from the IgM cDNA contains a Cys residue (Cys 92) in C μ 3 that could be involved in the linkage between the subunits. Moreover, the PX₃NXS/TL/VX₄E/DX₄CY motif required for multimeric polymerization (Wiersma et al., 1997; Yoo et al., 1999) is present in the IgM C-terminal secretory portion and the secretory part of the *P. waltl* IgM amino-acid sequence

presents, respectively, 70% and 55% of similarity with the secretory tail of human IgM and IgA. Our northern blotting and semi-quantitative RT-PCR experiments also demonstrate that IgM is the most abundant isotype throughout the life of *P. waltl*.

Similarities between urodele IgY antibodies

It was shown using a specific anti- ν monoclonal Ab that IgY is present in the intestinal mucosa of young axolotl from 1 month after hatching up to the seventh month (Fellah et al., 1992). Large numbers of IgX expressing B cells were also observed in the gut epithelium of *X. laevis*, while these cells were hardly detectable in the spleen (Mussmann et al., 1996). As no specific anti- ν Ab is available for *P. waltl*, we quantified IgY mRNA and demonstrated that the proportion of this isotype is higher in the intestine than in the spleen. We also detected IgY mRNA in the skin and the lungs. These data suggest that *P. waltl* and *A. mexicanum* IgY molecules could have the same function. Moreover, there is 51% of identity between the amino acid sequences of *A. mexicanum* and *P. waltl* IgY C-domains. However, on the contrary to *A. mexicanum*, the expression of IgY in the intestine of *P. waltl* starts after metamorphosis and is maintained during adulthood. This difference could be due to the fact that axolotl is neotenic while *P. waltl* has to go through metamorphosis to become adult.

Like higher vertebrates, *X. laevis* synthesizes IgM during the primary response and IgG-like IgY, by IgM-IgY switch, in the secondary response to thymus-dependent antigens (Du Pasquier et al., 2000). However, this does not seem to be the case in urodeles (Golub and Charlemagne, 1998). The lack of class switching in urodeles is supported by our observation that the VDJ associations expressed with $C\mu$ are different from those expressed with $C\pi$ (Table 2). This implies that the type of antigen receptor that is expressed by a B cell most probably defines its lineage throughout its lifetime, and that three distinct populations of B

cells exist in *P. waltl*: one expressing μ , one ν and another one π . Therefore, the change of the tissue-specific pattern of expression of IgY mRNA during *P. waltl* development could result from a progressive colonization of various tissues by IgY-producing B cells. These cells are located in the liver, lungs and skin in 100-day-old larvae, they are in the spleen 2 months after metamorphosis, and the intestine few weeks later.

The absence of class switching in urodeles raises the question of what do cause IgM, IgY and IgP expression? To answer this question we will have to determine how IgH genes are organized in the genome of *P. waltl*. Are they organized as in mammals, birds, reptiles and other amphibians in a so-called ‘translocon configuration’ in which there are many V genes upstream of D and J segments and C-exons or are they organized as in cartilaginous fish in the ‘cluster configuration’ with each cluster containing the rearranging V genes, D and J segments as well as constant region exons? In the cluster configuration there is no rearrangement between clusters or switching between isotypes. If *P. waltl* Ig genes have the translocon configuration, the three isotypes could be generated by alternative splicing of a large mRNA as for the expression of IgM and IgD in mouse and human B cells.

Potential origin of IgP

Our phylogenetic trees indicate that the CH1 and CH2 domains of IgP are evolutionarily closer to domains CH1 and CH2 of amphibian IgX and IgY and bird IgA while CH3 and CH4 are different from all other known isotypes. Recently, it was shown that bird IgA, *Xenopus* IgX and the IgA-like antibody from the leopard gecko originated through a recombination process that took place between IgM and IgY (CH1 and CH2 from IgY; CH3 and CH4 from IgM) (Deza et al., 2007). Similarly, one can imagine that IgP evolved from a recombination between IgY and another unknown isotype that is no longer expressed since

we could not find it in our Ig cDNA mini-libraries. However, the opposite might also be true: it is possible that IgY derives from IgP through a recombination process. Finally, another possibility is that IgP and IgY have been generated by duplication and the last two CH exons have diverged. Our current knowledge do not allow us to choose between these hypotheses.

IgP-producing B cells could be the physiological counterpart of mammalian B1-cells

We show here that IgP are expressed 20 days after hatching (Fig. 5) and that the proportion of IgP mRNA is four times higher in the spleens of larvae than in the spleens of adults (Fig. 7A). These data suggest that IgP play an important role during the larval life of *P. waltl*. Moreover, IgP present less combinatorial diversity than IgM (Fig. 8 and Table 2). These observations suggest some similarities between IgP-producing B cells and mammalian B1-cells. Indeed, in human, B1-cells are 3.5 times more abundant in the newborn B cell repertoire than in the one of adults (Chen et al., 1998) and natural Ab produced by these cells may use a restricted portion of the VH repertoire (Sanz et al., 1989).

B cells renewal during metamorphosis

During the metamorphosis of *X. laevis* there is a great tissue replacement of almost all cell types, including B cells (Du Pasquier et al., 1979). The change from the larval to the adult antibody repertoire occurs with a temporary immunodepression during metamorphosis (Hsu and Du Pasquier, 1992). This immune system reorganization may serve to eliminate unnecessary lymphocytes that could be destructive if they recognize newly emerging adult-specific antigens. Our data suggest that the same process likely occurs during *P. waltl* metamorphosis. Indeed, the expression of IgP decreases in the spleen after metamorphosis

while the one of IgY begins after metamorphosis, as shown in figure 7A. Thus IgP-expressing B cells could be replaced by IgY-expressing B cells in the spleen.

In conclusion, our work shows that *P. waltl* express three Ig isotypes: IgM, IgY and IgP. IgM are likely multimeric and are the most abundant antibodies in *P. waltl*. IgY seems to be the physiological counterpart of *A. mexicanum* IgY and mammalian IgA. The new isotype, IgP, plays a role during the larval life of *P. waltl*. And finally, a B cells renewal is likely associated to the metamorphosis of *P. waltl*.

Acknowledgements

We thank Pr L. Du Pasquier for critical reading and suggestions, C. Tankosic and N. Touche for technical support. This work was supported by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES). B.S. is supported by a CNES post-doctoral fellowship.

References

- Chen, Z.J., Wheeler, C.J., Shi, W., Wu, A.J., Yarboro, C.H., Gallagher, M., Notkins, A.L., 1998. Polyreactive antigen-binding B cells are the predominant cell type in the newborn B cell repertoire. *Eur. J. Immunol.* 28, 989-994.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., Steiner, L.A., 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* 6, 295-302.
- Deza, F.G., Espinel, C.S., Beneitez, J.V., 2007. A novel IgA-like immunoglobulin in the reptile *Eublepharis macularius*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 596-605.
- Du Pasquier, L., Blomberg, B., Bernard, C., 1979. Ontogeny of immunity in amphibians: changes in antibody repertoires and appearance of adult major histocompatibility antigens in *Xenopus*. *Eur. J. Immunol.* 9, 900-906.
- Du Pasquier, L., Robert, J., Courtet, M., Musmann, R., 2000. B-cell development in the amphibian *Xenopus*. *Immunol. Rev.* 175, 201-213.
- Fellah, J.S., Charlemagne, J. 1988. Characterization of an IgY-like low molecular weight immunoglobulin class in the Mexican axolotl. *Mol. Immunol.* 25, 1377-1386.
- Fellah, J.S., Ischaki, S., Vaerman, J.P., Charlemagne, J., 1992. Transient developmental expression of IgY and secretory component like protein in the gut of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev. Immunol.* 2, 181-190.
- Flajnik, M.F., 2002. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 688-698.
- Frippiat, C., Kremarik, P., Ropars, A., Dournon, C., Frippiat, J.P., 2001. The recombination-activating gene 1 of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) is transcribed in lymphoid tissues and in the central nervous system. *Immunogenetics* 52, 264-275.

- Ghanem, N., Lefranc, M.P., Lefranc, G., 1988. Definition of the RFLP alleles in the human immunoglobulin IGHG gene locus. *Eur. J. Immunol.* 18, 1059-1065.
- Golub, R., Charlemagne, J., 1998. Structure, diversity, and repertoire of VH families in the Mexican axolotl. *J. Immunol.* 160, 1233-1239.
- Hadji-Azimi, I., 1979. Anuran immunoglobulins. A review. *Dev. Comp. Immunol.* 3, 233-243.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., Hamers, R., 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446-448.
- Hansen, J.D., Landis, E.D., Phillips, R.B., 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 6919-6924.
- Hirono, I., Nam, B.H., Enomoto, J., Uchino, K., Aoki, T., 2003. Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 63-70.
- Hordvik, I., Thevarajan, J., Samdal, I., Bastani, N., Krossoy, B., 1999. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand. J. Immunol.* 50, 202-210.
- Hsu, E., Du Pasquier, L., 1992. Changes in the amphibian antibody repertoire are correlated with metamorphosis and not with age or size. *Dev. Immunol.* 2, 1-6.
- Musmann, R., Du Pasquier, L., Hsu, E., 1996. Is *Xenopus* IgX an analog of IgA? *Eur. J. Immunol.* 26, 2823-2830.
- Ohta, Y., Flajnik, M., 2006. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10723-10728.

- Parvari, R., Avivi, A., Lentner, F., Ziv, E., Tel-Or, S., Burstein, Y., Schechter, I., 1988. Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J.* 7, 739-744.
- Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M., Hood, L., Wall, R., 1980. Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell* 20, 303-312.
- Roux, K.H., Greenberg, A.S., Greene, L., Strelets, L., Avila, D., McKinney, E.C., Flajnik, M.F., 1998. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11804-11809.
- Saha, N.R., Suetake, H., Kikuchi, K., Suzuki, Y., 2004. Fugu immunoglobulin D: a highly unusual gene with unprecedented duplications in its constant region. *Immunogenetics* 56, 438-447.
- Sanz, I., Casali, P., Thomas, J.W., Notkins, A.L., Capra, J.D., 1989. Nucleotide sequences of eight human natural autoantibody VH regions reveals apparent restricted use of VH families. *J. Immunol.* 142, 4054-4061.
- Savan, R., Aman, A., Sato, K., Yamaguchi, R., Sakai, M., 2005. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur. J. Immunol.* 35, 3320-3331.
- Srisapoome, P., Ohira, T., Hirono, I., Aoki, T., 2004. Genes of the constant regions of functional immunoglobulin heavy chain of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics* 56, 292-300.
- Stenvik, J., Jorgensen, T.O., 2000. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. *Immunogenetics* 51, 452-461.

- Warr, G.W., Magor, K.E., Higgins, D.A., 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today*. 16, 392-398.
- Wiersma, E.J., Chen, F., Bazin, R., Collins, C., Painter, R.H., Lemieux, R., Shulman, M.J., 1997. Analysis of IgM structures involved in J chain incorporation. *J. Immunol.* 158, 1719-1726.
- Wilson, M., Bengten, E., Miller, N.W., Clem, L.W., Du Pasquier, L., Warr, G.W., 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4593-4597.
- Yoo, E.M., Coloma, M.J., Trinh, K.R., Nguyen, T.Q., Vuong, L.U., Morrison, S.L., Chintalacharuvu, K.R., 1999. Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain. *J. Biol. Chem.* 274, 33771-33777.
- Zhao, Y., Pan-Hammarstrom, Q., Yu, S., Wertz, N., Zhang, X., Li, N., Butler, J.E., Hammarstrom, L., 2006. Identification of IgF, a hinge-region-containing Ig class, and IgD in *Xenopus tropicalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12087-12092.

Figure legends

Figure 1: Alignment of the amino acid sequences of IgM (A) and IgY (B) C-domains. *P.w*: *Pleurodeles waltl*, *A.m*: *Ambystoma mexicanum*, *X.l*: *Xenopus laevis*, *H.s*: *Homo sapiens*, *M.m*: *Mus musculus*, *M.d*: *Monodelphis domestica*, *G.g*: *Gallus gallus*, *H.f*: *Heterodontus francisci*, *D.r*: *Danio rerio*, *X.sp*: *Xenopus* (**CAA62295**), *I.p*: *Ictalurus punctatus* (**P23735**), *F.r*: *Takifugu rubripes* (**AB125610**). *X.ly*: *Xenopus laevis* IgY, *X.lx*: *Xenopus laevis* IgX. Sequences are numbered according to IMGT (<http://imgt.cines.fr/>). Bars and dots indicate gaps and identical amino acids, respectively. Cys 92 in C μ 3, which is likely involved in the linkage between the subunits forming the multimeric IgM, is indicated with a black arrowhead. The penultimate cysteine of IgM that binds the J chain is circled. The potential N-glycosylation site in the secretory tail of IgM is underlined. Cys and Trp residues typical of Ig fold are shadowed. *, ■ and ♦ indicate Cys residues potentially involved in inter-heavy chain disulfide bridges, light chain binding, and extra inter-domain bounds, respectively.

Figure 2: The *P. waltl* IgP constant domains. Cys and Trp residues typical of Ig fold are shadowed. *, ■ and ♦ indicate Cys residues potentially involved in inter-heavy chain disulfide bridges, light chain binding, and extra inter-domain bounds, respectively.

Figure 3: Northern blotting analysis of *P. waltl* spleen and intestine poly A⁺ RNA. Membranes were hybridized to a mixture of 6 *P. waltl* VH family-specific probes (A), to GAPDH- and C μ - (B) or C ν - (C) or C π -specific probes (D).

Figure 4: Unrooted phylogenetic trees constructed from the amino acid sequences of the two first (A) or the two last (B) C-domains of different Ig heavy chains. Amino acid sequences of IgH C-regions were aligned using ClustalW and the tree was constructed by NJ method

supported with 1000 bootstrap replications using the MEGA3 software. The scale bar corresponds to the evolutionary distance. Bootstrap values >50% are indicated.

Figure 5: IgY and IgP expression during early stages of *P. waltl* development. Total RNA extracted from 2-5 eggs or larvae was reverse-transcribed. Forty cycles of amplification were performed with primers CY3+CY4, CP4+CP5 or Actin1+Actin2 (Table 1). Time elapsed since laying is indicated. Negative controls done without cDNA or with spleen RNA did not generate an amplification product. Positive controls were made with spleen cDNA.

Figure 6: IgM, IgY and IgP expression in different tissues from *P. waltl* before (A) and after (B) metamorphosis, as detected by RT-PCR. Forty cycles of amplification were performed with IgM-, IgY-, IgP- and GAPDH-specific primers (CU3+CU4, CY3+CY4, CP4+CP5, GAPDH1+GAPDH2) (Table 1). Negative controls done without cDNA or with spleen RNA did not generate an amplification product.

Figure 7: Evolution of the B cell populations during *P. waltl* development. Expression of IgM, IgY and IgP have been determined by semi-quantitative RT-PCR in the spleen (A) and intestine (B) of 3 animals for each developmental stage. Results are expressed as a percentage of the total amount of Ig transcripts. *, **, #, ##, ♦ and ♦♦ indicate groups of results that are significantly different ($p < 0.5$).

Figure 8: VH (A), DH and JH (B) usage in μ and π heavy chains from a 100-day-old larva. Roman numerals indicate VH families, DH and JH segments. Areas of the sectors correspond to the proportion of μ and π cDNA sequences containing the respective VH families, DH or JH segments. 34 μ and 44 π sequences were analyzed. '0' indicates direct VH-JH joining.

Figure 1 A-IGHM

	1	10	20	30	40	80	90	100	110	120
	87654321123.....12.....									
Ch1										
P.w	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A.m	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
X.l	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H.s	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
M.m	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
M.d	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G.g	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H.f	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
D.r	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Ch2										
P.w	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A.m	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
X.l	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H.s	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
M.m	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
M.d	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G.g	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H.f	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
D.r	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Ch3										
P.w	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A.m	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
X.l	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H.s	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
M.m	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
M.d	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G.g	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H.f	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
D.r	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Ch4										
P.w	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A.m	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
X.l	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H.s	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
M.m	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
M.d	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
G.g	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H.f	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
D.r	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

B- IGHY

	1	10	20	30	40	80	90	100	110	120
	87654321123.....				1234567...12345677654321.....12.....					
Cu1		◆								
P.w	DQSPKPSVPLVSCCGAES----	STNVDIGCLAT	GYLP--EPVTV		AWDQNGSITS---	GIRTEPAVRHKG	-----SHYSLSSVSVSSADW--	KTK-TYKC	LVKHEP--	TNTNT DKTV
A.m	A.....F...P...STP----	D...S...V. ...G--...E.			S.KA--T.MP--GK...	AQQA-----	TAL.T..QIRIPAYE--	G.N-S.S. S...K.--S.EI	H..I	
X.ly	ATLHA...F..RP...SS.S--DSH.T...	S. .F.--A..D.			K.NS-.....LKN...	LQSS-----	GLFAS..Q.TIPLS..--	A.KSFE. N.E.K.--S.KV	TQKI	
X.lx	VTA.A...F..IP..DNVDF--NDS.TM...V. .	MA--D.LDI			Q.ND-.....T---.K.MRP.LSDVD-----	GL.T...Q.TILASE.---NS-....	K.V.NY-----KQ	E.SL		
Cu2		*								
P.w	SSAVCKTATS-----	KPAVQVLQSSCDDL	DG--NGSTELICLVS	GYSP--DKIK	VQWLRNG-ETTF	L-PAYTSPSIKGRE-----	GTFTSTTSQVNI	SKSDW--ILGERYT	C KVDHPA--	TNTSL HDSIRNC
A.m	T..E..K.....S.....A.T.-----	V..I. .T--N.Q			R..V.D-KWAPI-QGQ....	PQ.DGQ-----	I.VT.AS.DK...	E.....SSRA	E.T.H..AD.	
X.ly	ECQD-EPEPI-----	E.T.EI..GP.ASS-----	K.V..L..IT ..A.--SE..		H..L..-QV.NI-SPSN.KPC.EEN-----	SR.K.SVP.EH.--NSEDS...	T.....SH.KT	EA.TKK.-D		
X.lx	KVLP.MAPHVQLFLQS.CMSDAI.RAQHENI--	ATLD.L.IIN	NFYH--GQ..		K..V..KQDVSA-E.SVPTPS.TED-----	Y.SS..LR.L.GM.--NK.TQ.S.	I.T.TS--S..TT	IAN.SQ.T.Q		
Cu3										
P.w	PSGVQLKVSMTIPP	PKAKDLYV--TKQPSIVCQVT	KMESA-DGLS		ITWQKQEDGSPL---	VGLPHETEVL	PD-----	GTLGADSTLTITTD	AW--KQGS	AFSC KVEHPD--
A.m	ETPY.P..FL.A..R...I--AN..VVI.KI. .	NS..S..			V...RRE.PEE--AAVIS.QYIDS.-----	FT.M.Y.N..KNE.--ER.DE.T.	K.F.--PF.L	S.SVS..T		
X.ly	ETAITP..DVL..SP...L...EAKVY.VIS	R.A.T--D.T			VQ.SRS..KKA--LAFDSAP.KAY.-----	FTVK...K.SPGD.--ENKKQ.N.	V.....P..I	EKS.Q.SQ		
X.lx	CHDN.Q.YPLT.TFH...F--SRNAKVT.L.S	KTI-ENFD			S.ER.KAGN.---EFVTEDPVLHDN-----	YSVA.I.SVCAED.--ES.DK...	T.RSQ.--P...	KK..F.QN		
Cu4										
P.w	EREIGPSMYLFP	PPHQHELDQ--HELVSLTCLVK	GFSP--PDIY		VQWKRNTVLPD	SSRNTALVLES	GTN--GPD	TYFMYSL	LLTISKS	NW--ENRDTYSC
A.m	G.SFA.T..V.A..EM..AN--YDF.....	S....D...			I...QGKS.I.SD-KYVSM	EPQ.A.A--LG...S.M...Q..D.--DK.E	FT.V.A...V...L.	T.R..PL.K		
X.ly	DPGTE.TIT.L..SDD..RN--DFI..I.ML.	N.R.--Q...			F...KDGVT.EED-YYMT.TP...EEE-----	EGFISF.K...AR.D.--MRGA...	..A.-----NTIS	..D.K.N..		
X.lx	EGTPKA.DV..L..SAQ..I.--Q.M.T...F.T	..N.--KE.F			I..MQGGV	TSIED-KFI..VPMKSD.E-----	Q...I..K.A.PAAK.--NQG.VFT.	WVG.E...LYIT	.Q..D.SS.K	

Figure 2

C π 1 ■◆ EHISKPTVYPLVNCCGSQSGTNVAIGCLVTDYLPEPVEVTWNGNPISNEVKIYSSSVLKSTQKYIRSSHLYVPTSDWESKKYTCTVVKHQSTSPEVSHTV

C π 2 ◆ * SSSVCASKQIDPTVQLLLLPSCVDKIQLTCLLTNYTPSGLNVKWLNVNGKNIEMSKLSTFKEFKADSKTLVGWSLLRVTKESWEKGDYTCNNVIREKSKQPFSEMYNISRCS *

C π 3 ACAKITPGLWVYVPVPSYQEILNSKVSVACLVLGQDLKNARFSWELNGKPGPDSLLEAIKEHENKTQSRLMKLAVTPAEWINKSTTYQCKVTNVCGMETKEGLITTRD

C π 4 SKLQLKNPTVTILNPNVEDPSEAESLTLFDVITNFYPEDISIEWKNNKMLVEKAHYTNGPVSCGPTCTYSILRVGKDEGGDYTCVVRHVTLKTSPEATITVDVF

GGVIPRSFGEHQPEFGGWSSNDSRTVL	Secretory tail	Acid-rich domain	TM region	Cyto-tail
		TMKPVIAIDIPRDFHDQGGYDLSELDEAGSVWTTASTFIALFLLTLLYSSSFVTFVKVK		

Figure 3

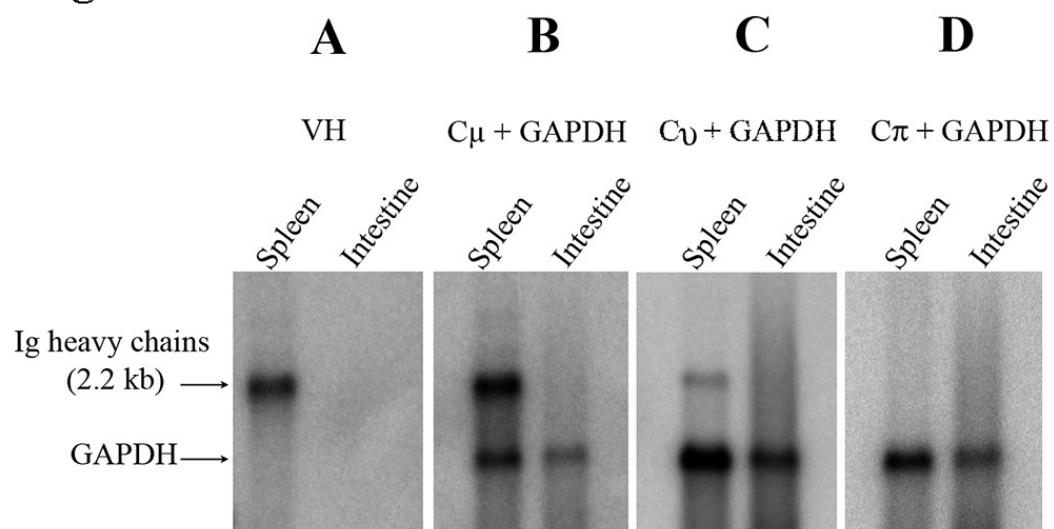


Figure 4

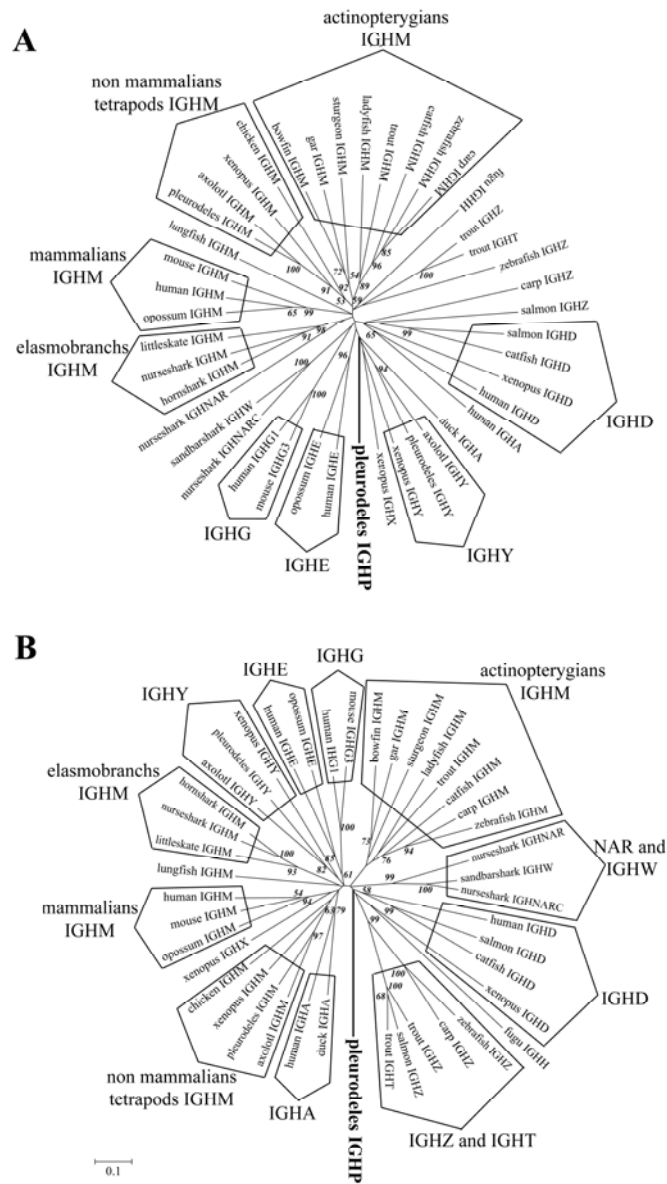


Figure 5

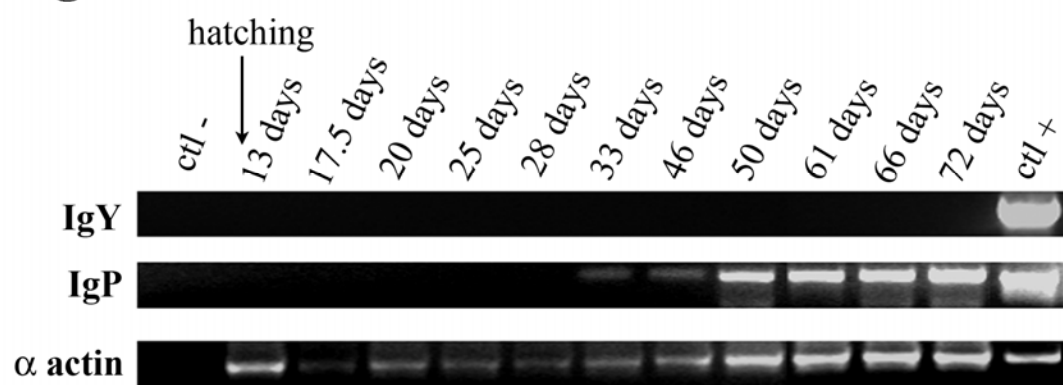
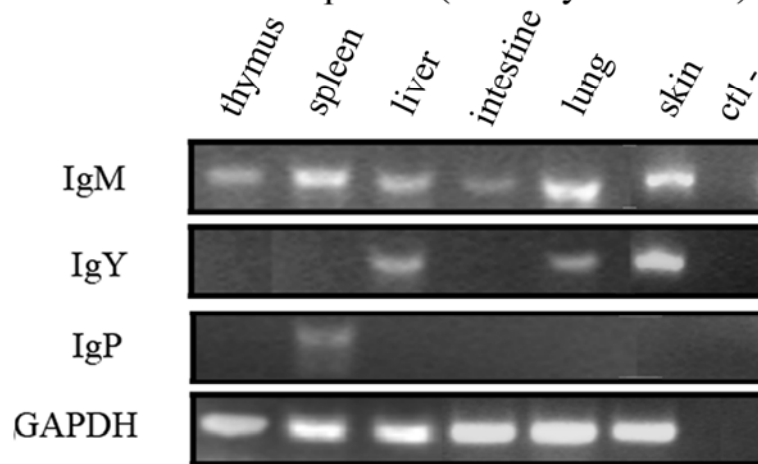


Figure 6

A Before metamorphosis (100-day-old larva)



B After metamorphosis (2-year-old adult)

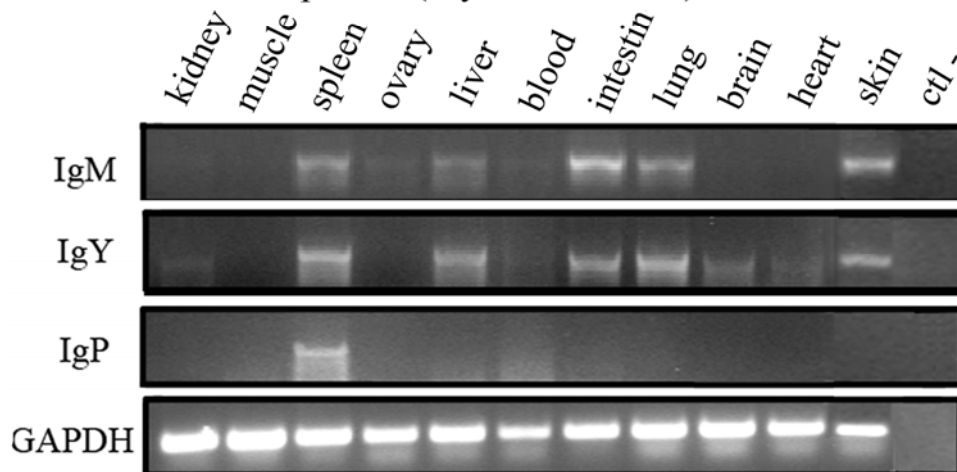


Figure 7

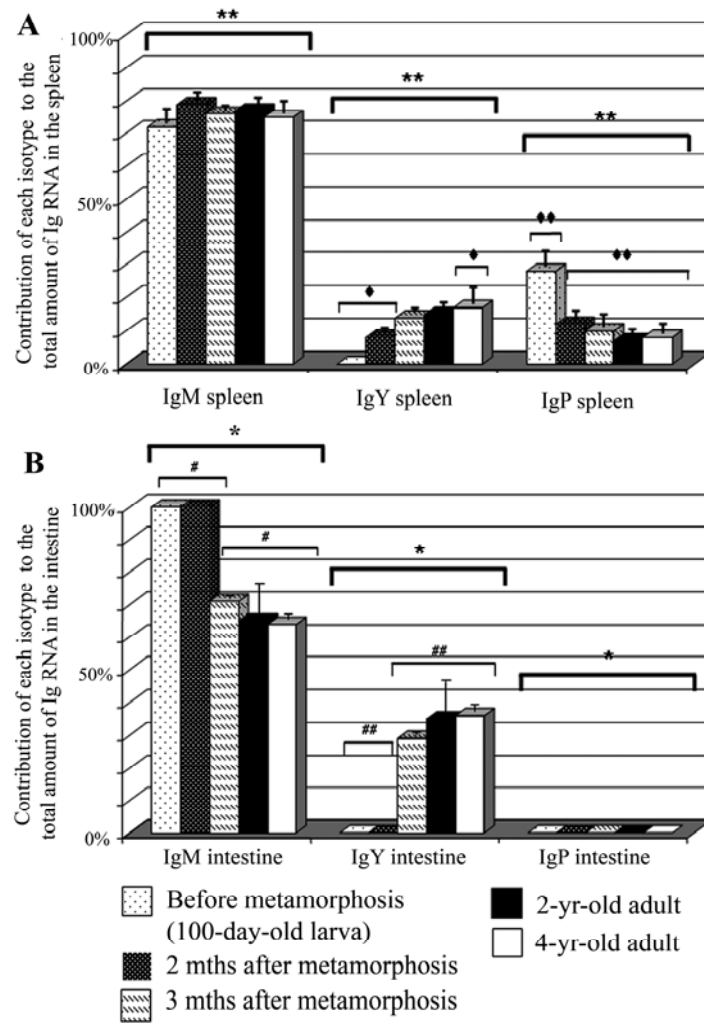


Figure 8

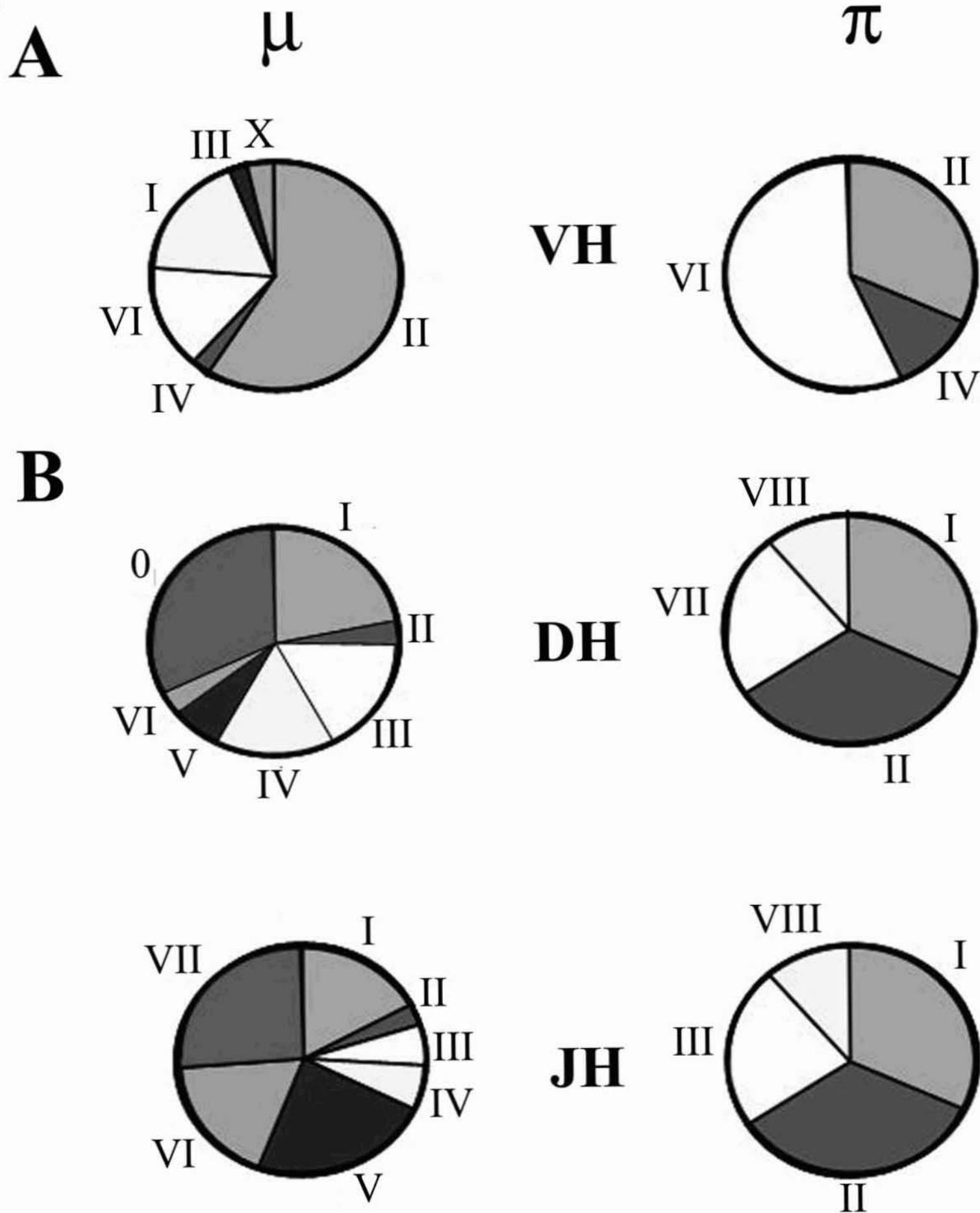


Table 1: Primers used in this work (K=G or T, R=A or G, Y=C or T)

Primer name	Primer sequences (5' to 3')	CH primer location	Annealing temps (°C)
Actin1	GGC AAT GAG CGT TTC CGA TG		54
Actin2	GCA CTT GCG GTG GAC AAT GG		54
CP1	CAC CAC AAG GGA CTC AAA ACT CCA GCT G	C π 3-C π 4	65
CP2	CTT GAC ACG GTA TGG CTG ACT TCA GGG C	C π 1	60
CP3	CGG TTT ATC CGT TGG TAA ATT GTT GTG GG	C π 1	59
CP4	GGA GGT GAC TTG GAG CAA CGG CAA CC	C π 1	59
CP5	GCT TCC CAT TAA GCT CCC AGC TGA AA	C π 3	59
CU1	GGT TGC GGG GCA TCC TCT GA	C μ 1	59
CU2	GGG CAG TGG GTA AAA GCC TC	C μ 2	59
CU3	TGA CAA AGA AAC TGG AGA TGC GAG TTC AAA GAG	C μ 1-C μ 2	59
CU4	TGG GTT TCC ATT TTT CTT CTG GAG GTA GGC	C μ 3-C μ 4	59
CU5	CTT TGT CAC AGG TTG TCC C	C μ 1-C μ 2	59
CU6	CCA GGT GAA GGT GGT TGA GTC GGG AGG	C μ 1	64
CU7	AGG ACC GAG CAC TGC CTA CCT CCA GAA G	C μ 3	65
CY1	GAT CAA CCA TCA AAG CCT TC	C ν 1	59
CY2	ATT GCC ATC GAG GTC ATC AC	C ν 2	59
CY3	CCT GCG GTT CAA GTC CTC CAA TCT TCC TGT	C ν 2	59
CY4	ACC AAT CTC ACG CTC TTT TGG CTT TCT GAT GG	C ν 3-C ν 4	59
CY5	GTC TGT ATT GGT GTT TGT GGG C	C ν 1	59
CY6	GCA TCG CAA CAC CGT CCT CCC TGA CAA C	C ν 4	65
GAPDH1	ACT ACA AAG GAC TAG GTC AGG		54
GAPDH2	CCG GTA TTG CAC TCA ACG ACC		54
IGMAXO1	ACA AGC CCC GTC TGT CTA TC	C μ 1	59
IGMAXO2	CGA TCG TTC CCA TGT TAG TG	C μ 3	59
IGYAXO1	GCT GCT CAG CAA CAA GCT AC	C ν 1	59
IGYAXO2	TTG GCT TGG AGA CAC TTC TG	C ν 3	59
JHAXO	CTG GGG ACA AGG CAC CCT GGT CAC CGT CAC TTC		68
VHA	AGG CAG GCT CCK GGG AAR GG		54
VHB	GYT TTY AGK YTG TYC ATT TG		54
VHGSP1	AGG CAG GCT CCG GGG AAG GGC CTA		65
VHs1	CTA TTC TTG GTA TTT GCG G		60
VHs2	CAG ATA ACT TTG ACC CAA TCG GGG TCA GAA ATC AG		60
VHs3	GTA ATC CTG ACC CAG TCC GGA GAC GTT GTC ACA AAG		60
VHs4	CAG ATC ACG CTG TTG GAA TCT GGT CCA GGG ATG		60
VHs5	TGC AGG AGT CCG GCC CTG GGA CTG TGA AGC CT		60
VHs6	CTG GTG CAG TCT GGG GAA GGA CTT CTG AAG		60
VHr1	TCT CGC ACA GTA ATA CTT GGC A		60
VHr2	CAG ATA GAG AGA GGA ACT GTC TGT GGA GGC GGT GAA TCT		60
VHr3	ACT CAT GTG TAG GGA CGC CGT GCT GGC GGC GTT ATC		60
VHr4	CGA AGT AAT ACA CGC CTG AGT CTT CGG CTC T		60
VHr5	CCG AGC ACA GTA AAA CGT GGC CGT GTC CTC TG		60
VHr6	TGC ACA GTA ATA TGT TCC TTG GTC ATC GGC		60

Table 2 : VDJ associations involving VHII and VHVI genes in IgM and IgP heavy chain cDNAs of the 100-day-old larva. The number of time a particular VDJ association is observed is indicated between brackets. * indicates that sequences are different.

IgM	IgP
VHII-DHIV-JHII (1)	VHII-DHI-JHI* (14)
VHII-DHI-JHV (2)	
VHII-JHVII (4)	
VHII-JHV (1)	
VHII-DHI-JHVII (1)	
VHII-JHI (4)	
VHII-DHV-JHV (1)	
VHII-DHII-JHI (1)	
VHII-DHVI-JHV (1)	
VHII-DHI-JHIII (1)	
VHII-DHI-JHI* (1)	
VHII-DHIV-JHV (1)	
VHVI-DHIV-JHIV (1)	VHVI-DHII-JHII (15)
VHVI-DHI-JHVI (1)	VHVI-DHVII-JHIII (10)
VHVI-DHI-JHIII (1)	
VHVI-JHVII (1)	
VHVI-DHIV-JHVI (1)	

Partie 2 : Changements de l'expression des gènes VH après un séjour de longue durée dans l'espace

I. Introduction

Durant l'expérience Genesis décrite dans l'introduction, deux pleurodèles adultes appelés V3R et V4R sont restés durant 5 mois dans la station spatiale Mir, période durant laquelle ils ont été immunisés avec des protéines. En parallèle, deux autres pleurodèles, S1R et S4R, ont été immunisés dans les mêmes conditions mais sur Terre. Ces animaux sont, à ce jour les seuls à avoir été immunisés durant un séjour de longue durée dans l'espace. Suite à cette expérience, les membres de l'équipe Développement et Immunogénétique ont montré que l'expression des familles VHII et VHVI, utilisées pour fabriquer les chaînes lourdes d'IgM, est modifiée par le séjour dans l'espace (figure 20). Chaque famille VH comprenant un ou plusieurs gènes, nous avons voulu connaître la contribution de chaque gène VHII et VHVI au répertoire de chaînes lourdes d'IgM chez les animaux immunisés dans la station Mir et ceux immunisés sur Terre. Ces nouvelles analyses permettront ainsi d'approfondir et de mieux comprendre les précédents résultats.

II. Nombre de gènes VHII et VHVI présents dans le génôme de *P. waltl*

Avant d'étudier la contribution des différents gènes VHII et VHVI utilisés pour construire les chaînes lourdes d'IgM, nous devons avant tout connaître le nombre de ces gènes existant dans le génôme de *P. waltl*. Par la méthode de Southern Blotting, nous avons montré qu'il y a de 1 à 3 gènes VH appartenant à la famille VHII et de 4 à 6 gènes VH appartenant à la famille VHVI dans le génome de cet amphibien, selon l'enzyme de restriction utilisée (figure 21). Ces observations sont des estimations car plusieurs gènes VH d'une même famille peuvent se trouver sur un même fragment de restriction ou un gène peut être coupé par une des enzymes.

III. Gènes VH utilisés lors de la réponse humorale des animaux immunisés

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

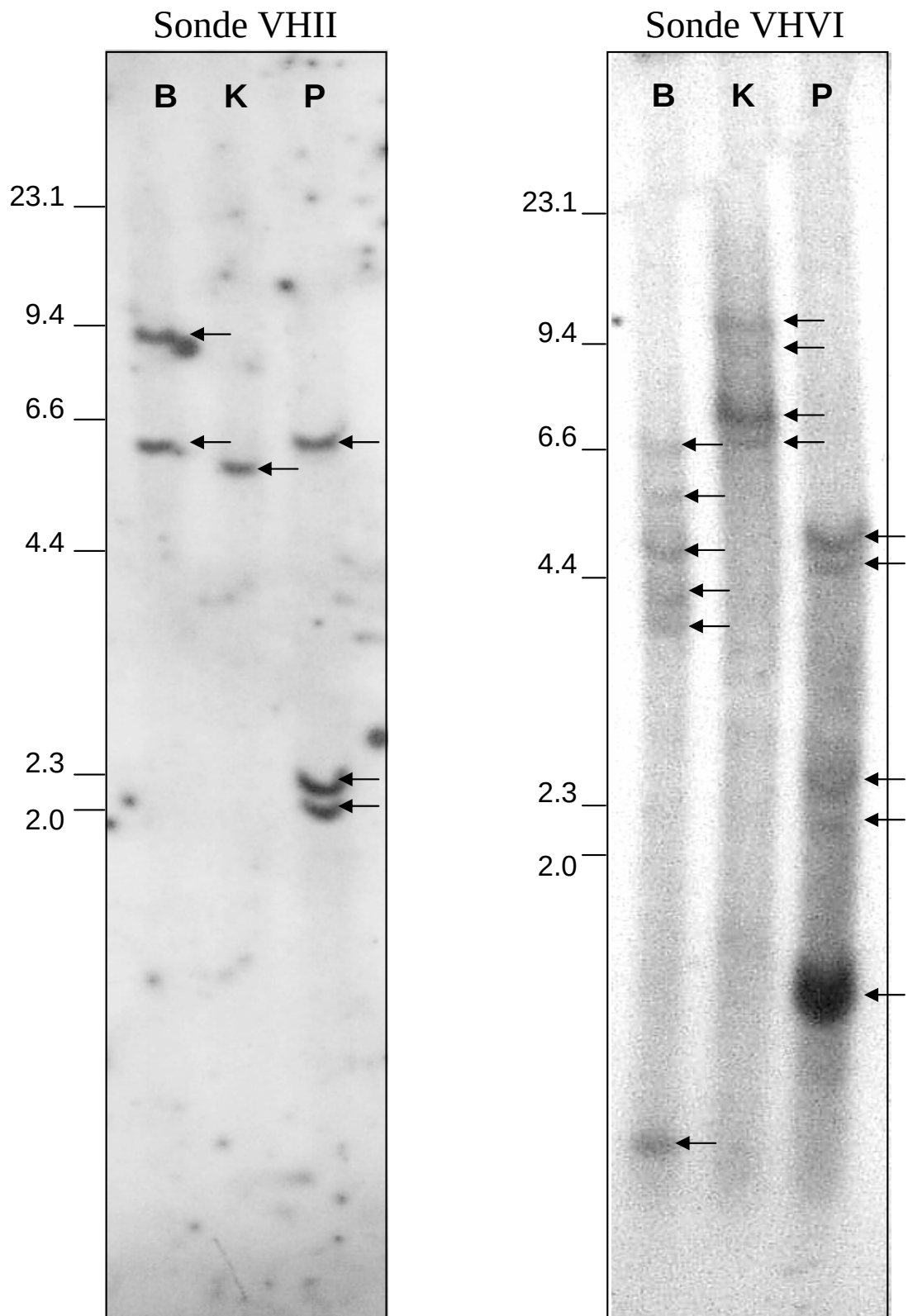


Figure 21: Analyse de l'ADN génomique de *P. waltl* par Southern blotting. B, K et P sont les abréviations respectives des enzymes de restriction *Bam*H I, *Kpn* I et *Pst* I. Les différents profils sont indiqués par des flèches. L'échelle de poids moléculaire est en Kb.

Une banque d'ADNc partiels de chaînes lourdes d'IgM a ainsi été créée pour chaque animal, mis à part pour les animaux non-immunisés dont les rates avaient été mélangées, et donc pour lesquels une seule banque a été créée. Des 5 banques obtenues, nous avons isolé et séquencé 100 clones contenant un domaine VHII et 78 clones contenant un domaine VHVI. Notons que 98% de ces ADNc ont une phase ouverte de lecture. Afin de déterminer de combien de gènes VHII et VHVI dérivent ces ADNc, nous avons aligné les séquences des peptides signaux, précédés d'au moins 40 pb de 5'UTR, de tous les ADNc contenant un domaine VHII (données non-présentées) ou VHVI (figure 1A, publication 3) comme ce qui avait précédemment été réalisé pour analyser la réponse humorale de *Xenopus laevis* [190]. Pour les ADNc contenant un domaine VHVI, un alignement supplémentaire a été réalisé avec les domaines VHVI complets et les gènes VHVI.C et VHVI.D non-réarrangés (figure 1B, publication 3).

Ces alignements de séquences ont permis de déterminer qu'un seul gène VHII est utilisé pour créer les 100 réarrangements VHII-D-JH isolés à partir des animaux immunisés au sol ou en vol. La famille VHII étant observée dans 28% des ARNm de chaînes lourdes d'IgM pour les animaux immunisés sur Terre et dans 61% des ARNm de chaînes lourdes d'IgM pour les animaux immunisés dans Mir [272] (figure 20), nous pouvons conclure que l'expression du gène VHII est deux fois plus élevée chez les animaux soumis aux conditions spatiales.

Concernant les ADNc contenant un domaine VHVI, les deux phylogrammes ont révélé 4 groupes majeurs (figure 1, publication 3). Ceci signifie que 4 gènes VHVI sont utilisés par les animaux immunisés pour fabriquer leurs chaînes lourdes d'IgM. Ces 4 gènes ont été appelés : VHVI.A ; VHVI.B ; VHVI.C ; VHVI.D. Chez les animaux non-immunisés, seuls 2 ADNc correspondent à un de ces 4 gènes (figure 1, publication 3). Notons que pour le gène VHVI.D, deux sous-groupes sont observés indiquant qu'il existe probablement deux allèles pour ce gène. De manière intéressante, les groupes d'ADNc dérivant des gènes VHVI.A et VHVI.B sont uniquement composés de séquences provenant des animaux immunisés sur Terre. A partir du nombre d'ADNc isolés pour chaque gène VHVI, nous avons calculé la contribution de chaque gène aux chaînes lourdes d'IgM chez les animaux immunisés sur Terre et dans Mir (figure 2, publication 3). Les figures 1 et 2 de la publication 3 montrent clairement que l'expression des gènes VHVI est différente dans l'espace.

IV. Expression individuelle des gènes VHVI

Nous avons ensuite vérifié cette variation de l'expression des gènes VHVI par PCR semi quantitative. Tout d'abord, nous avons réalisé des PCR saturantes (35 cycles) sur de l'ADNc de rate des 4 animaux immunisés (figure 3A, publication 3) avec des amorces

spécifiques des gènes VHVI.B et VHVI.C. Les gènes VHVI.A et VHVI.D étaient trop homologues (95% d'identité entre leurs séquences nucléiques) pour qu'on puisse définir des amorces les amplifiant séparément. Ces premières PCR confirment que le gène VHVI.B est quasi exclusivement exprimé chez les animaux immunisés sur Terre alors que le gène VHVI.C est exprimé chez les 4 animaux. La spécificité des amorces a été vérifiée par restriction enzymatique des produits de PCR (figures 3B et 3C, publication 3). Après ces vérifications, nous avons quantifié les transcrits d'IgM fabriqués à partir des gènes VHVI.B et VHVI.C. Le gène VHVI.B n'étant présent qu'à l'état de trace chez les animaux immunisés dans Mir, il n'a pas été quantifié chez ces derniers. Chez les 2 animaux immunisés sur Terre (S1R et S4R), le gène VHVI.B représente 11% des transcrits de chaînes lourdes d'IgM (figure 4A, publication 3) ce qui est en accord avec le résultat décrit dans la figure 2. Le gène VHVI.C représente, quant à lui, 17% des transcrits de chaînes lourdes d'IgM chez les animaux immunisés sur Terre et 27% chez les animaux immunisés dans Mir (figure 4B, publication 3). Pour les animaux immunisés sur Terre, ce résultat correspond à ce qui est observé dans la figure 2, mais pour les animaux immunisés dans Mir ce résultat est supérieur à ce qui est obtenu dans la figure 2. Cette différence est probablement due au nombre moins élevé de clones séquencés pour les animaux immunisés dans Mir (27 clones) par rapport au nombre de clones séquencés pour les animaux immunisés sur Terre (38 clones). Ces résultats de PCR semi-quantitative sont très stables entre les paires d'animaux d'une même condition ce qui est certainement dû au fait que les animaux sont consanguins. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée par une expérience décrite dans la figure 22.

En conclusion, ces résultats démontrent clairement que le séjour dans l'espace a provoqué une augmentation de l'expression des gènes VHVI.C et VHII, et une diminution de l'expression des gènes VHVI.A et VHVI.B. Chaque lymphocyte B n'exprimant qu'un réarrangement de chaîne lourde d'anticorps, ces résultats suggèrent fortement que des populations différentes de lymphocytes B ont été sélectionnées dans l'espace. Ce changement d'expression des gènes VH chez les animaux V3R et V4R ne peut pas être dû à une infection à bord de la station Mir car les 2 animaux étaient dans des containers séparés du 19^{ème} jour de l'expérience jusqu'à la fin de la mission. Ces changements ne peuvent pas non-plus être attribués à une différence du répertoire de gènes VH entre les animaux immunisés dans Mir et ceux immunisés sur Terre car 1) nos pleurodèles sont consanguins, et 2) nous avons précédemment observé une expression similaire des familles de gènes VH chez des pleurodèles adultes non-immunisés (Boxio *et al*, non-publié). Ces changements sont donc

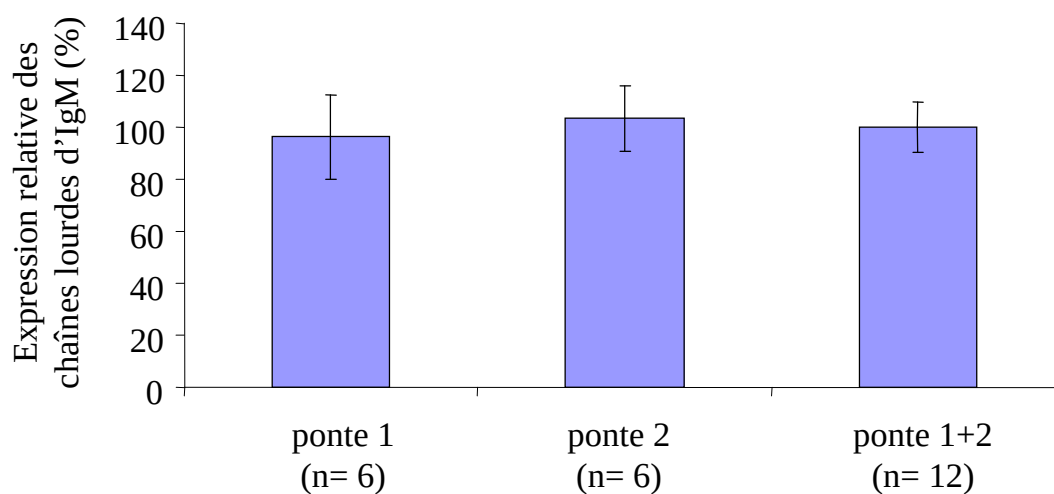


Figure 22: Expression relative des chaînes lourdes d'IgM dans des larves de *P. waltl* de deux pontes obtenues à partir de parents différents. La valeur relative obtenue avec les 12 larves a été fixée à 100%. Dans cette expérience, nous avons choisi au hasard 6 larves âgées de 14 jours issues de 2 pontes sur les 4 qui étaient disponibles durant la période de reproduction dans notre laboratoire. Ces 12 larves, qui étaient élevées dans les mêmes conditions (même eau, même éclairage, même température...), ont été sacrifiées et les ARNm de leurs chaînes lourdes d'IgM ont été quantifiées par RT-PCR en temps réel. Les PCR ont été réalisées en triplicata et répétées 4 fois pour chaque larve. Un test T de Student indique qu'il n'y a pas de différence statistique entre les 2 pontes ($p = 0.734$).

certainement dus à un effet du séjour dans l'espace sur le système immunitaire. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que la microgravité réelle et simulée modifient la composition lymphocytaire de la rate [225, 232, 252, 281]. Ce changement de la composition cellulaire pourrait expliquer pourquoi des lymphocytes B différents ont été sélectionnés en microgravité. D'autres facteurs, comme le stress et les radiations, pourraient également être responsables du changement des populations lymphocytaires spléniques [282-286].

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

Comme les réarrangements VHII-D-JH sont observés chez les animaux immunisés et non-immunisés, nous avons étudié leur région CDR3 afin d'être sûr que ces réarrangements sont impliqués dans la réponse immunitaire. La figure 23 montre un exemple de cette analyse. Comme chez l'humain, la région CDR3 d'une chaîne lourde d'anticorps de pleurodèle est hypervariable (voir chapitre II.3 de l'introduction). Cette région contient la fin du gène VH, un ou deux éléments D et le début du segment JH. Entre ces éléments sont rajoutés des séquences palindromiques (P) et des nucléotides aléatoires (N) durant la recombinaison VDJ. Nous avons calculé la diversité jonctionnelle des 100 réarrangements VHII-D-JH séquencés. Nous avons mesuré la longueur en nucléotides des parties hypervariables (D+N+P) des CDR3 et la longueur de ces CDR3 (figure 23). Le ratio R entre la valeur de D+N+P et la longueur de CDR3 a ensuite été calculé pour chaque séquence. Ce ratio indique la variabilité de chaque CDR3. La moyenne de ces 3 valeurs a ensuite été calculée (D+N+P, CDR3, R) pour les 4 animaux immunisés et les 2 animaux non-immunisés. Ces 3 valeurs moyennes ne sont pas statistiquement différentes entre les 4 animaux immunisés mais diffèrent nettement de celles des animaux non-immunisés (table 2, publication 3). De plus, Collis *et al* [1] ont montré que la longueur du CDR3 joue un rôle clé dans la topographie du site de fixation à l'antigène. Des anticorps reconnaissant des protéines possèdent un CDR3 de chaîne lourde d'environ 10.9 acides aminés. Cette valeur est similaire à la valeur moyenne observée pour les 4 animaux immunisés (33 pb soit 11 acides aminés). Cette observation est logique car les animaux ont été immunisés avec des protéines. Ces données confirment donc que les réarrangements VHII-D-JH chez les animaux immunisés ont bien été sélectionnés suite à la stimulation antigénique.

Clone	Fin du gène VH A R D	Séquence D+N+P	Début du segment JH	F	JH	D	CDR3	D+N+P	R	RF de D
S1VH2_1	GCACGGGACG	ATGGG	TACTACTTCGATTAC	F	1	3 ou 4	30	5	0.17	
S1VH2_18	GCACGGGACG	CTGGTGGCCAGGGC	TACTTCGATTAC	F	1	1	36	14	0.39	RFIII
S1VH2_10	GCACGGGACG	AACAGCAGCCC	TACTTCGATTAC	F	1	6	33	11	0.33	RFII
S1VH2_12	GCACGG	CCAATATGGGGCAG	ATGCTTCTTTTGATTAC	F	2	3	38	15	0.39	RFIII
S1VH2_8	GCACGGGACG	GTCTGGG	TGCTTTCGATTAC	F	3	1 ou 5	30	7	0.23	
S1VH2_9	GCACGGG	GTGGACTGGG	TAATGCTTTCGATTAC	F	3	1 ou 5	33	10	0.30	
S1VH2_17	GCACGGGACG	CTGGCCCTC	ATGCTTTCGATTAC	F	3	5	33	9	0.27	RFIII
S1VH2_16	GCACGGGACG	AGAAC	GCTTTCGATTAC	F	3		27	5	0.19	
S1VH2_23	GCACGGGAC	ATGGGG	AATGCTTTCGATTAC	F	3	3	30	6	0.20	RFII
S1VH2_19	GCACGGGA	AATGGGGCAAT	TTATGGATTTCGACTAC	F	4	3	36	12	0.33	RFII
S1VH2_7	GCACGGG	TTTCTACAGCCCTT	ATTATGGATTTCGACTAC	F	4	6	39	15	0.38	RFI
S1VH2_21	GCACGGGA	ATGGACTGGGGATATGGGAGCAATG	TGGGATTTCGACTAC	F	6	1 + 4	48	25	0.52	RFI + RFI
S1VH2_3	GCACGGG	GCTACAGCAG	CTGGGATTTCGACTAC	F	6	6	33	10	0.30	RFIII
S1VH2_4	GCACGGGACG	CGAAC TGGGC	TGGAGCTTTTGATATT	F	5	5	36	10	0.28	RFII
S1VH2_5	GCACGGG	GCCTG	GGAGCTTTTGATATT	F	5		27	5	0.19	
S1VH2_6	GCACGGGACG	GACTGGGG	TATGGAGCTTTTGATATT	F	5	1	36	8	0.22	RFII
S1VH2_11	GCACGGGAC	TACAGCAGG	GGTAGCAGCTTCGATGTG	F	7	6	36	9	0.25	RFIII
S1VH2_2	GCACGGGACG	GC	AGCAGCTTCGATGTG	F	7		27	2	0.07	
S1VH2_14	GCACGGG	GCATGGGACTT	AGGTAGCAGCTTCGATGTG	F	7	7	36	10	0.28	RFI

Figure 23: Exemple d'étude réalisée sur les CDR3 des ADNc de chaînes lourdes d'IgM avec un domaine VHII pour l'animal S1R. Chaque CDR3 a été divisé en trois parties: AR(D) représente la fin de la séquence en acides aminés du gène VH, D+N+P est l'ensemble des nucléotides provenant de l'élément D (souligné), des nucléotides (N) ajoutés par la TdT et des palindromes (P), et JH indique le début de l'élément JH. F indique une séquence d’ADNc fonctionnelle (traduction *in silico*). Les colonnes JH et D définissent le numéro de l'élément présent dans l’ADNc. Dans certains cas il n'était pas possible de définir exactement l'élément D (cases avec un "ou"). "+" signifie que deux éléments D ont été utilisés dans ce réarrangement. Les tailles des CDR3 et de D+N+P, exprimées en nucléotides, sont indiquées dans les colonnes ‘CDR3’ et ‘D+N+P’. R = (D+N+P)/CDR3. La colonne RF de D donne le cadre de traduction de l'élément D (I, II ou III).

Publication 3 (*FASEB journal*, 2009)

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

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

^{*}EA 3442, Nancy-University, Laboratory of Experimental Biology and Immunology, Development and Immunogenetics group. Boulevard des Aiguillettes, BP 239. F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France.

[†]University of Luxembourg, Life Sciences Research Unit. 162a, avenue de la Faïencerie. L-1511 Luxembourg.

Short title: Humoral immunity changes after spaceflight

¹Correspondence: Dr J.-P. Frippiat, EA 3442, Nancy-University. Boulevard des Aiguillettes, BP 239. F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France.

Tel: +33 3 83684494. Fax: +33 3 83684196. E-mail: Jean-Pol.Frippiat@scbiol.uhp-nancy.fr

Abstract

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

Key Words: microgravity, humoral immune response, B lymphocytes, selection

Introduction

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

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

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

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

Materials and Methods

Animals

We have reared *P. waltl* in our laboratory for 20 years. Our animals are derived from those originally reared by Prof Gallien in Paris in the sixties and have never been bred with wild *P. waltl*. The initial breeding pool comprised fourteen males and ten females. Animals have consistently undergone brother-sister mating. As there are two breeding periods per year (one from September to November and another one from February to April), forty generations have been produced in our laboratory and our animals are therefore considered inbred. Additionally, they are reared under controlled conditions approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (agreement number DDSV54/SPA/07/130). In these conditions, their life expectancy is about eight years.

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

And finally, we demonstrated that *P. waltl* possesses at least ten families of VH genes, eight JH and eight D segments in its genome and that it uses these genes and segments in the same way as humans to create functional antibody heavy chain genes (unpublished observations).

The Genesis experiment

The Genesis experiment was performed from April 02, 1999 to August 28, 1999 onboard the Mir space station during the Perseus French-Russian mission. Three groups of three-year-old adult *P. waltl* were used in this experiment. The first group was composed of two unimmunized *P. waltl* which were reared in classic conditions in our animal facilities. The second group was composed of two *P. waltl* that stayed onboard Mir for five months. These animals, called V3R and V4R, were reared in classic conditions in our animal facilities before the flight but the feeding and living conditions were modified in the space station. Animals were immunized, kept in the dark in boxes inserted in a temperature-controlled unit ($18 \pm 2^{\circ}\text{C}$) on dampened towels and force-fed three times a week. The food was administrated using a syringe with a catheter because *P. waltl* cannot take food themselves in microgravity. After the return to Earth, animals were reared in classic conditions until their sacrifice ten days later. Originally, four males and four females were launched but only two females survived. The other six animals died on day 17 or 18 after launch by anoxia due to a breakdown in the ventilation system. After this incident, it was decided to keep the two surviving females in separate boxes, which were ventilated twice a day until the end of the mission. The third group was composed of two *P. waltl*, S1R and S4R, which were immunized with the same antigen and reared in our laboratory in the same conditions as onboard Mir. Animals were treated in accordance with National Legislation and The Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for Experimental

and Other Scientific Purposes 86/609/EEC. Additional experimental details about animals rearing conditions have been described previously (12).

Southern blotting

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

Construction and screening of the VH-C μ cDNA libraries

The spleen was removed from the two animals reared in classic conditions on Earth (unimmunized controls) and total RNA was extracted from pooled splenocytes using the acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform method (16). The same technique was used to isolate total RNA from the spleens of S1R, S4R, V3R and V4R. Using the Smart Race cDNA kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA), the Advantage 2 Polymerase Mix that contains a proofreading polymerase (Clontech, Palo Alto, CA, USA) and the CMGSP1 primer (Table 1), which anneals to the C μ 1 exon that encodes the first constant domain of the *P. waltl* IgM heavy chains, we amplified the VH-D-JH rearrangements contained in the IgM heavy chain

mRNAs from the spleens of S1R, S4R, V3R, V4R and the mixture of the spleens of the two unimmunized *P. waltl* by 5'-RACE PCR. For each RNA sample, a PCR product of 0.6 kb containing the VH-D-JH rearrangements joined to C μ was amplified, gel purified and cloned in the pGEM-T Easy vector (Promega, Lyon, France) to produce five VH-C μ cDNA libraries. There was one library produced per animal, except for the unimmunized animals which were pooled. Probes specific for the VHII or VHVI families (those used for the Southern blotting experiments) were labeled with [α -³²P]dCTP and used to screen the five VH-C μ cDNA libraries by colony hybridization. Clones that hybridized to the VHII family-specific probe contained VHII-D-JH rearrangements joined to C μ , while those that hybridized to the VHVI family-specific probe contained VHVI-D-JH rearrangements joined to C μ . We randomly chose 100 clones that hybridized to the VHII family-specific probe (21 from the library made from unimmunized animals, 22 from the V3R library, 21 from the V4R library, 19 from the S1R library and 17 from the S4R library) and 78 that hybridized to the VHVI family-specific probe (5 from the library made from unimmunized animals, 17 from the V3R library, 15 from the V4R library, 23 from the S1R library and 18 from the S4R library). We sequenced the whole inserts of these 178 clones. We were only able to isolate five VHVI positive clones from the library made from unimmunized animals because the VHVI family is rarely used when animals are not immunized (8). Sequence analyses were performed using free online software from the Pasteur Institute (<http://bioweb.pasteur.fr>). Sequence alignments were performed using CLUSTALW (17).

We estimated the error rate of the Advantage 2 Polymerase Mix using the sequence of C μ 1 (the exon encoding the first constant domain of the IgM heavy chains). Indeed, a part of this exon was amplified with the VHII-D-JH and the VHVI-D-JH rearrangements when we performed the 5'-RACE PCR and it has been demonstrated (18) that the constant regions of Ig chains are not the target of somatic hypermutations. In a total of 12,087 bases sequenced,

we identified 11 mutations indicating an error rate of 0.09%. While this rate is slightly greater than the one calculated by the manufacturer (25 errors per 100,000 bp after 25 PCR cycles) it still remains low. The error rate we have determined suggests that 0.291 mutations per VH sequence are produced by the Advantage 2 Polymerase Mix.

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

We used the Universal GenomeWalker kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA), *P. waltl* genomic DNA and the VH2gen, VH6Cgen and VH6Dgen primers (Table 1) to isolate the VHII, VHVI.C and VHVI.D genes in their germline configurations. Primer VH6Cgen was located at the beginning of the leader sequence of the cDNAs derived from VHVI.C (Figure 1A). Primers VH2gen and VH6Dgen were located in the 5' UTR of the cDNAs derived from VHII and VHVI.D, respectively. The Universal GenomeWalker kit generated PCR products that began at the end of the VH2gen, VH6Cgen and VH6Dgen primers and extended into the adjacent genomic DNA. PCR products were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Lyon, France) and sequenced on both strands to provide the genomic sequences of the VHII, VHVI.C and VHVI.D genes starting from primers VH2gen, VH6Cgen and VH6Dgen. Since the VH6Cgen primer was located in the leader sequence, the first 15 bp of the VHVI.C leader exon are missing. These genomic sequences have been submitted to the EMBL database and have been assigned the accession numbers FM877013, FM877014 and FM877015.

RT-PCR on RNA extracted from the spleen

Specific reverse transcription was performed using 1 µg of spleen RNA from the various animals, primer CU4 (Table 1) and MMLV-reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a final volume of 20 µl. Primer CU4 was designed to anneal to the end of the third and the beginning of the fourth constant domains of the *P. waltl* IgM heavy

chains to ensure that it could not hybridize to genomic DNA. Using VHVI.B-(VH6LB+VH6B), VHVI.C-(VH6LC+VH6C) or C μ -specific (CU3+CU4) primers (Table 1) and Goldstar Taq DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium), we performed 35-cycle PCR reactions with 1 μ l of the generated cDNA. Primers VH6LB and VH6LC were located in the 5' UTR upstream of the VHVI.B and VHVI.C leader exons, while primers VH6B and VH6C were located in the VHVI.B and VHVI.C exons to ensure that genomic DNA could not be amplified. For the same reason, primer CU3 was located at the junction between the C μ 1 and C μ 2 exons. VHVI.B (260 bp long) and VHVI.C (264 bp long) PCR products were digested with *Bpi*I and *Sma*I to verify the specificity of the amplifications. As expected, the VHVI.B PCR products were completely digested by *Bpi*I but not by *Sma*I, and the VHVI.C PCR products were completely digested by *Sma*I but not by *Bpi*I. The expected lengths for the digestion products were observed in both cases. These data demonstrate the specificity of our VHVI.B and VHVI.C primers. Negative controls were performed with spleen RNA.

Semi-quantitative RT-PCR

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

Results

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

We previously demonstrated that immunization induced the synthesis of IgM in which the heavy chains are produced using genes of the VHII and VHVI families (8). Because VH families may contain several members, we performed Southern blotting experiments to estimate the number of VH genes belonging to the VHII or VHVI families of *P. waltl*. The hybridization pattern obtained with the VHII family-specific probe revealed one to three bands, indicating that the *P. waltl* VHII family is composed of one to three VHII genes. Similarly, the VHVI family-specific probe revealed four to six bands, demonstrating that the VHVI family comprises four to six members (data not shown). These figures are estimates because several VH genes of the same family could be on the same restriction fragment or one gene could be cut into two fragments by a restriction enzyme.

Expression of individual VH genes

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

VHVI domains from the 78 VHVI-D-JH rearrangements and the germline VHVI.C and VHVI.D genes (Figure 1B).

These sequence alignments demonstrated that the 100 VHII-D-JH rearrangements joined to C μ and the VHII gene have the same 5' UTR and leader exons as well as very similar VH domains (data not shown). This indicates that these cDNAs are derived from the VHII gene that we have sequenced (accession number FM877013 in the EMBL database). Because we previously established that the VHII family is found in 28% of the IgM heavy chain mRNAs from animals immunized on Earth and 61% of these mRNAs in animals immunized onboard Mir (8), we can conclude that the expression of this VHII gene is two-fold greater in animals subjected to spaceflight conditions.

The results of the analyses of the VHVI-D-JH rearrangements are presented in Figure 1. The phylograms reveal four major groups having identical or almost identical 5' UTRs and leader sequences (Figure 1A) and related VHVI domains (Figure 1B). This indicates that four VHVI genes were used by the immunized animals to produce their IgM heavy chain mRNAs. These four genes were arbitrarily named VHVI.A, VHVI.B, VHVI.C and VHVI.D. Only two cDNAs from unimmunized animals, CU1 and CU20 (Figure 1), corresponded to one of these four VHVI genes. Figure 1B also indicates that the cDNAs attributed to the VHVI.D gene form two sub-groups, which suggests that there may be two alleles of this gene. The alignment of the complete cDNA sequences indicates that cDNAs from sub-groups 1 and 2 have the same 5'UTR and leader sequences (see Figure 1A) and that all VH sequences from sub-group 2 differ from those of sub-group 1 by three point mutations and one insertion of 3 bp (data not shown). This number of point mutations is not rare between alleles of V genes (see the tables of alleles presented in the IMGT database, <http://imgt.cines.fr/>) and polymorphisms by the insertion or deletion of few bp in V genes have already been described (20). Interestingly, Figure 1 also shows that two groups of cDNAs, those derived from the

VHVI.A and VHVI.B genes, are comprised only of sequences from animals immunized on Earth. Figure 2 shows the contributions, calculated from the number of cDNAs attributed to each VHVI gene, of the VHVI genes to the IgM heavy chain cDNAs of animals immunized on Earth or in the space station. Taken together, Figures 1 and 2 indicate that the expression of individual VHVI genes is different under spaceflight conditions.

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

To verify the quantities of IgM heavy chain transcripts encoded by the VHVI.B and VHVI.C genes (Figure 2), we performed semi-quantitative RT-PCR with our VHVI.B- and VHVI.C-specific primers, which generated amplicons of 260 and 264 bp, respectively. We could not produce smaller amplicons, as required for quantitative real-time PCR, because VHVI.B and VHVI.C belong to the same VH family and genes within a VH family share greater than 80% sequence homology (21). As seen in Figure 3A, the expression of VHVI.B is very low in the spleens of V3R and V4R and was therefore not quantified. Figure 4A indicates that VHVI.B is found in 11% of the S1R and S4R IgM heavy chain transcripts. This percentage is in agreement with the data presented in Figure 2, which indicated that 15% of IgM heavy chain mRNAs were derived from VHVI.B when animals are immunized on Earth.

Figure 4B shows that VHVI.C is found in 17% of the IgM heavy chain transcripts of animals immunized on Earth and in 27% of these mRNAs in animals immunized in space. Figure 2 provided a similar percentage (14%) of IgM cDNAs derived from VHVI.C for animals immunized on Earth but a lower value (10%) for animals immunized in space. This underestimation may be due to the fact that we did not sequence as many clones for flown animals (27 clones sequenced) as we did for animals immunized on Earth (38 clones sequenced). Figure 4B also shows that the expression of VHVI.C is two times greater when animals are immunized onboard Mir.

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

CDR3 regions of the VHII-D-JH rearrangements

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

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

Discussion

Changes in VH gene expression under spaceflight conditions

Numerous logistical and technological hurdles exist when performing biological spaceflight experimentation (e.g. we could not use rodents for the Genesis experiment) and a limited number of opportunities to conduct such research are available. Furthermore, these experiments are extremely expensive. Therefore, even when a low number of samples are recovered from a space experiment, they deserve to be studied because they are rare and precious. Although a small number of individuals were studied, our results show that a long-term spaceflight affects the expression of immunoglobulin VH genes in response to antigenic challenge. Indeed, our work indicates that animals immunized on Earth or in space used the same VHII gene to generate their IgM heavy chains, but the expression of this VHII gene is two times greater under spaceflight conditions. We also observed that animals immunized on Earth used four different VHVI genes to generate their IgM heavy chains, while animals immunized in space used only two VHVI genes (Figure 2). Furthermore, the expression of the VHVI.C gene is increased in microgravity (Figure 4B).

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

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

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

The changes in the expression of the VHII and VHVI genes are unlikely due to an infection by an unknown antigen in the space station, as V3R and V4R were kept in separate boxes from day 19 of the experiment until the end of the space mission 129 days later. It is also unlikely that these changes result from a difference in the germline repertoire between the spaceflight and the ground-based animals because (i) our *P. waltl* are inbred, (ii) we previously observed a similar VH family use between unimmunized *P. waltl* (Boxio R., unpublished observations) and (iii) a similar VH family use was observed between animals immunized with the same antigen (8). Consequently, these changes in the VH gene expression most likely reflect the impact of the spaceflight on the immune response.

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

spaceflight animals. Thus, different VH-D-JH rearrangements are expressed in spaceflight animals, suggesting that different IgM-producing B lymphocytes are selected in these environmental conditions.

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

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

Radiation may also change the splenic lymphocyte populations. Several studies have shown that the mass and leukocyte populations of the spleen are modified when mice are

subjected to various types of radiation (41-44). Significant decreases in IgG1, IgG2b and IgG2a in mice exposed to chronic low-dose gamma-irradiation have also been reported (45).

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

Acknowledgments

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

References

1. Kimzey, S. L. (1977) Hematology and immunology studies. In *Biomedical results from Skylab* (Johnson, R. S., and Dietlein, L. F., eds) pp. 248-282, NASA, Washington, DC
2. Borchers, A. T., Keen, C. L., and Gershwin, M. E. (2002) Microgravity and immune responsiveness: implications for space travel. *Nutrition* **18**, 889-898
3. Sonnenfeld, G., and Shearer, W. T. (2002) Immune function during space flight. *Nutrition* **18**, 899-903
4. Heppener, M. (2008) The future of humans in space. *EMBO Rep.* **9 Suppl 1**, S4-12
5. Stowe, R. P., Sams, C. F., Mehta, S. K., Kaur, I., Jones, M. L., Feedback, D. L., and Pierson, D. L. (1999) Leukocytes subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 179-186
6. Voss, E. W. Jr. (1984) Prolonged weightlessness and humoral immunity. *Science* **225**, 214-215
7. Konstantinova, I. V., Rykova, M. P., Lesnyak, A. T., and Antropova, E. A. (1993) Immune changes during long-duration missions. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 189-201
8. Boxio, R., Dournon, C., and Fripiat, J.-P. (2005) Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Appl. Physiol.* **98**, 905-910
9. Dournon, C. (2003) Developmental biology of urodele amphibians in microgravity conditions. *Adv. Space Biol. Med.* **9**, 101-131
10. Fripiat, C., Kremarik, P., Ropars, A., Dournon, C., and Fripiat, J.-P. (2001) The recombination-activating gene 1 of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) is transcribed in lymphoid tissues and in the central nervous system. *Immunogenetics* **52**, 264-275

11. Schaerlinger, B., Bascove, M., and Fripiat, J.-P. (2008) A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. *Mol. Immunol.* **45**, 776-786
12. Veynachter, L., Tankosic, C., Viso, M., Chaput, D., Husson, D., Gualandris-Parisot, L., and Dournon, C. (2002) A new method to force-feed and rear adult newts on board a space station. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* **2**, 100-108
13. Birnstein, V.J. (1983). Structural characteristics of genome organization in Amphibia: Differential staining of chromosomes and DNA structure. *J. Mol. Evol.* **18**, 73-91
14. Bailly, S., Guillemain, C., and Labrousse, M. (1973) Comparaison du nombre et de la position des zones spécifiques révélées sur les chromosomes mitotiques de l'Amphibien Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. par les techniques de coloration au colorant de Giemsa et à la moutarde de quinacrine. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* **276**, 1867-1869
15. Schaerlinger, B., and Fripiat, J.-P. (2008) IgX antibodies in the urodele amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 908-915
16. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159
17. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680
18. Jacobs, H., and Bross L. (2001) Towards an understanding of somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 208-218

19. Wilson, M., Hsu, E., Marcuz, A., Courtet, M., Du Pasquier, L., and Steinberg, C. (1992) What limits affinity maturation of antibodies in *Xenopus* - the rate of somatic mutation or the ability to select mutants? *EMBO J.* **11**, 4337-4347
20. Lefranc, M.-P., Pallarès, N., and Fripiat, J.-P. (1999) Allelic polymorphisms and RFLP in the human immunoglobulin lambda light chain locus. *Hum. Genet.* **104**, 361-369
21. Brodeur, P. H., and Riblet, R. (1984) The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. *Eur. J. Immunol.* **14**, 922-930
22. Wu, T. T., Johnson, G., and Kabat, E. A. (1993) Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* **16**, 1-7
23. Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575-581
24. Komori, T., Okada, A., Stewart, V., and Alt, F. W. (1993) Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* **261**, 1171-1175
25. Collis, A. V., Brouwer, A. P., and Martin, A. C. (2003) Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J. Mol. Biol.* **325**, 337-354
26. Sonnenfeld, G., Butel, J.S., and Shearer, W.T. (2003) Effects of the space flight environment on the immune system. *Rev. Environ. Health* **18**, 1-17
27. Gould, C.L., Lyte, M., Williams, J.A., Mandel, A.D., and Sonnenfeld, G. (1987) Inhibition of interferon-gamma but normal interleukine-3 production from rats flown on the space shuttle. *Aviat Space Environ Med* **58**, 983-986
28. Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793
29. Cogoli A., Tschopp, A., and Fuchs-Bislin, P. (1984) Cell sensitivity to gravity. *Science* **225**, 228-230

30. Cogoli-Greuter, M. (2004) Effect of gravity changes on the cytoskeleton in human lymphocytes. *Gravit. Space Biol. Bull.* **17**, 27-37
31. Pecaute, M. J., Nelson, G. A., Peters, L. L., Kostenuik, P. J., Bateman, T. A., Morony, S., Stodieck, L. S., Lacey, D. L., Simske, S. J., and Gridley, D. S. (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. I. Immune population distributions. *J. Appl. Physiol.* **94**, 2085-2094
32. Sonnenfeld, G., Mandel, A. D., Konstantinova, I. V., Berry, W. D., Taylor, G. R., Lesnyak, A. T., Fuchs, B. B., and Rakhmilevich, A. L. (1992) Spaceflight alters immune cell function and distribution. *J. Appl. Physiol.* **73**, 191S-195S
33. Grove, D. S., Pishak, S. A., and Mastro, A. M. (1995) The effect of a 10-day space flight on the function, phenotype, and adhesion molecule expression of splenocytes and lymph node lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* **219**, 102-109
34. Vernikos, J. (1996) Human physiology in space. *BioEssays* **18**, 1029-1037
35. Morey-Holton, E. R., and Globus, R. K. (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.* **92**, 1367-1377
36. O'Donnell, P. M., Orshal, J. M., Sen, D., Sonnenfeld, G., and Aviles, H. O. (2008) Effects of exposure of mice to hindlimb unloading on leukocyte subsets and sympathetic nervous system activity. *Stress*, in press (DOI: 10.1080/10253890802049269)
37. Bennett, M. F., and Daigle, K. R. (1983) Temperature, stress and the distribution of leukocytes in red-spotted newts, *Notophthalmus viridescens*. *J. Comp. Physiol.* **153**, 81-83
38. Bouic, P. J., Clark, A., Lamprecht, J., Freestone, M., Pool, E. J., Liebenberg, R. W., Kotze D., and van Jaarsveld, P. P. (1999) The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *Int. J. Sports Med.* **20**, 258-262

39. Glaser, R., Sheridan, J., Malarkey, W. B., MacCallum, R. C., and Kiecolt-Glaser, J. K. (2000) Chronic stress modulates the immune response to a pneumococcal pneumonia vaccine. *Psychosom. Med.* **62**, 804-807
40. Glaser, R., and Kiecolt-Glaser, J. K. (2005) Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 243-251
41. Pecaut, M. J., Nelson, G. A., and Gridley, D. S. (2001) Dose and dose rate effects of whole-body gamma-irradiation: I. Lymphocytes and lymphoid organs. *In Vivo* **15**, 195-208
42. Gridley, D. S., Pecaut, M. J., Dutta-Roy, R., and Nelson, G. A. (2002) Dose and dose rate effects of whole-body proton irradiation on leukocyte populations and lymphoid organs: part I. *Immunol. Lett.* **80**, 55-66
43. Pecaut, M. J., Dutta-Roy, R., Smith, A. L., Jones, T. A., Nelson, G. A., and Gridley, D. S. (2006) Acute effects of iron-particle radiation on immunity. Part I: Population distributions. *Radiat. Res.* **165**, 68-77
44. Gridley, D. S., Rizvi, A., Luo-Owen, X., Makinde, A. Y., Coutrakon, G. B., Koss, P., Slater, J. M., and Pecaut, M. J. (2008) Variable hematopoietic responses to acute photons, protons and simulated solar particle event protons. *In Vivo.* **22**, 159-169
45. Courtade, M., Caratero, A., Joza, S., Pipy, B., and Caratero, C. (2001) Influence of continuous, very low-dose gamma-irradiation on the mouse immune system. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 587-592
46. Allebban, Z., Ichiki, A. T., Gibson, L. A., Jones, J. B., Congdon, C. C., and Lange, R. D. (1994) Effects of spaceflight on the number of rat peripheral blood leukocytes and lymphocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 209-213

Figure legends

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

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

Figure 3: VHVI.B, VHVI.C and C μ expression in the spleens of animals immunized on Earth (S1R and S4R) or onboard the Mir space station (V3R and V4R) (**A**). Thirty-five cycles of amplification were performed with VHVI.B-, VHVI.C- and C μ -specific primers (Table 1).

Negative controls with spleen RNA did not generate an amplification product. VHVI.B (**B**) and VHVI.C (**C**) PCR products were digested with *BpiI* (B) and *SmaI* (S). Undigested PCR products (ND) were run on the same agarose gels for comparison. The VHVI.B PCR products were completely digested by *BpiI* but not by *SmaI*, and the VHVI.C PCR products were completely digested by *SmaI* but not by *BpiI*, demonstrating the specificity of our VHVI.B and VHVI.C primers. Sizes (in bp) of the 100 bp DNA ladder (MW) are indicated on the left.

Figure 4: Contributions of VHVI.B (**A**) and VHVI.C (**B**) to the IgM heavy chain mRNAs of animals immunized on Earth (S1R and S4R) or onboard the Mir space station (V3R and V4R), as determined by semi-quantitative RT-PCR. mRNAs derived from VHVI.B were not detected at high enough levels to be quantified in the spleens of V3R and V4R (see Figure 3A). Experiments were performed at least four times. Signals are expressed as a percentage of the total amount of the IgM heavy chain mRNAs. * indicates statistically significant differences ($p < 0.05$). # indicates differences that are not statistically significant.

Figure 1

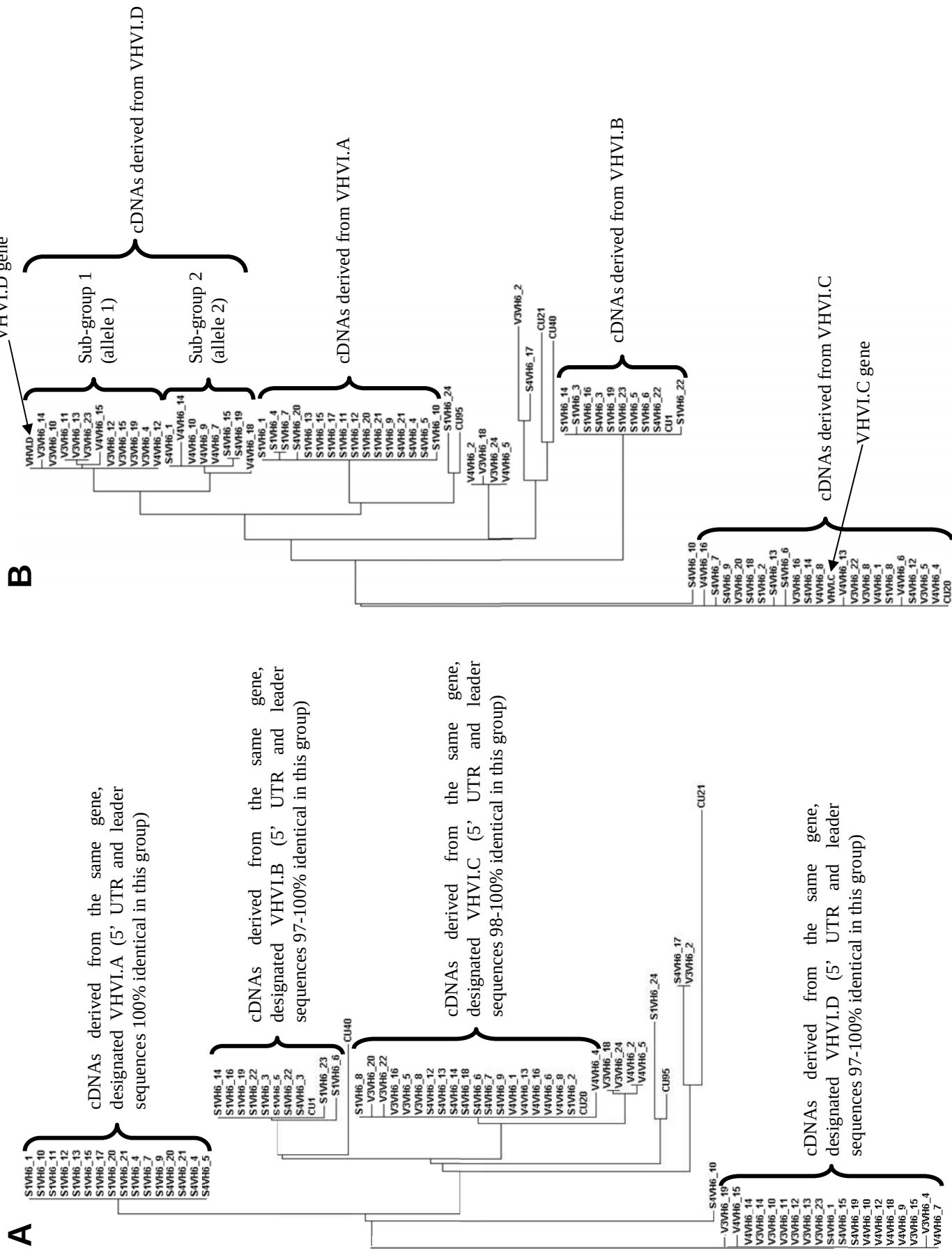


Figure 2

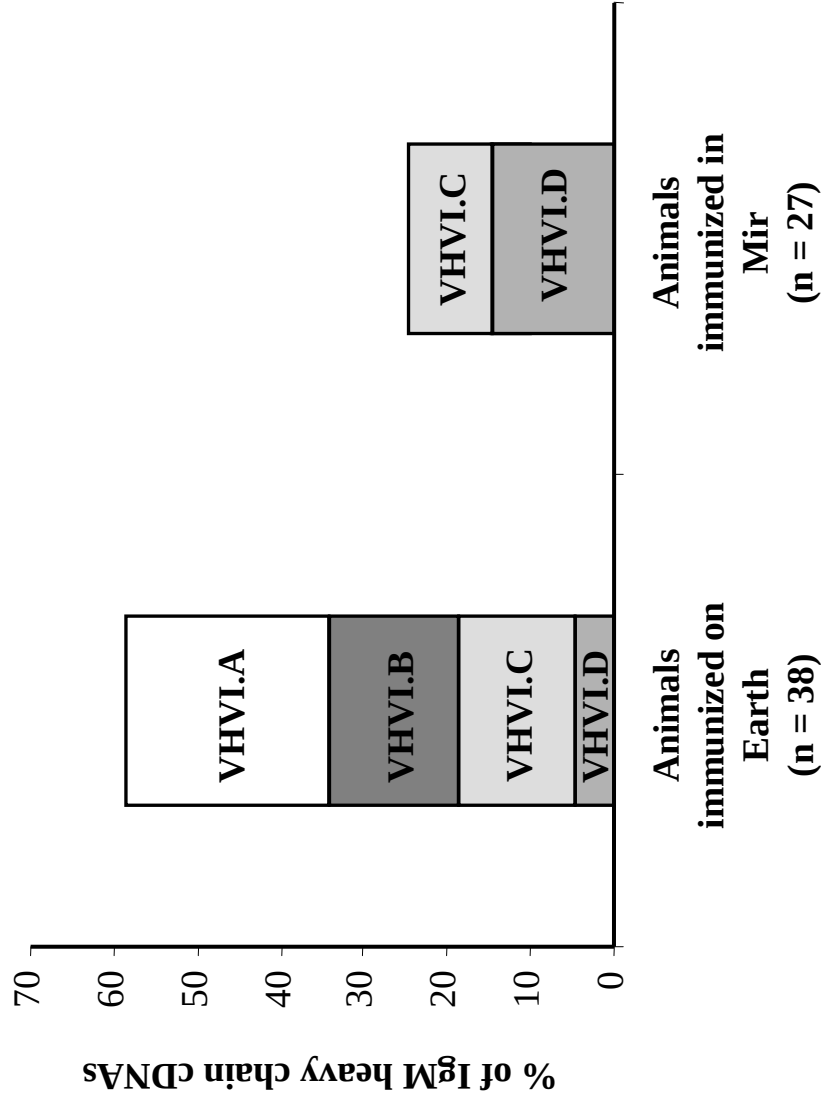
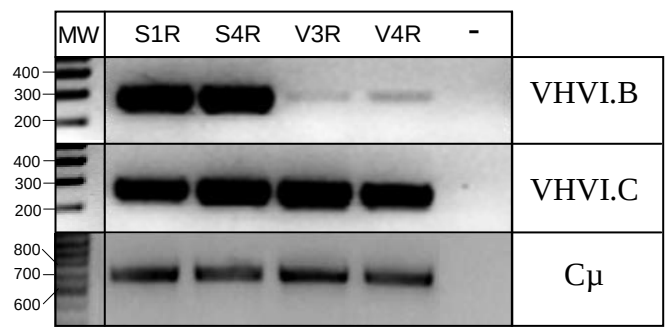
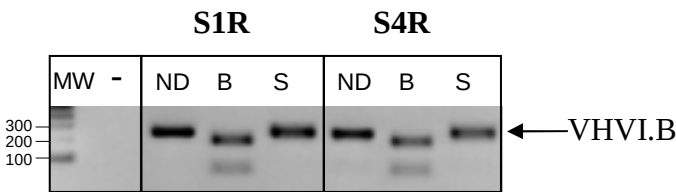


Figure 3

A



B



C

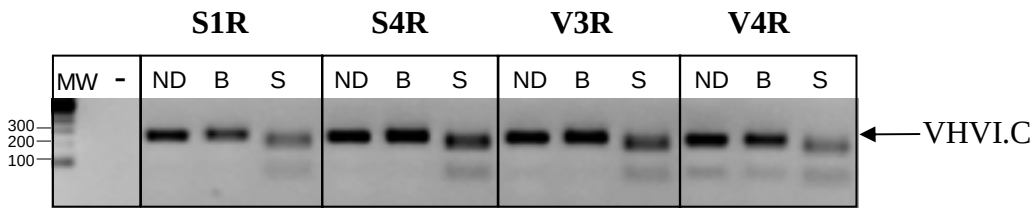
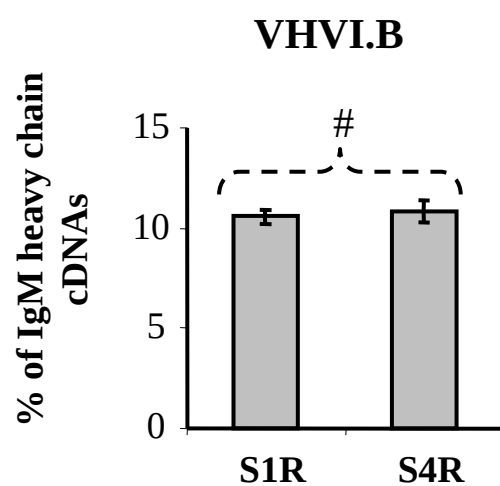


Figure 4

A



B

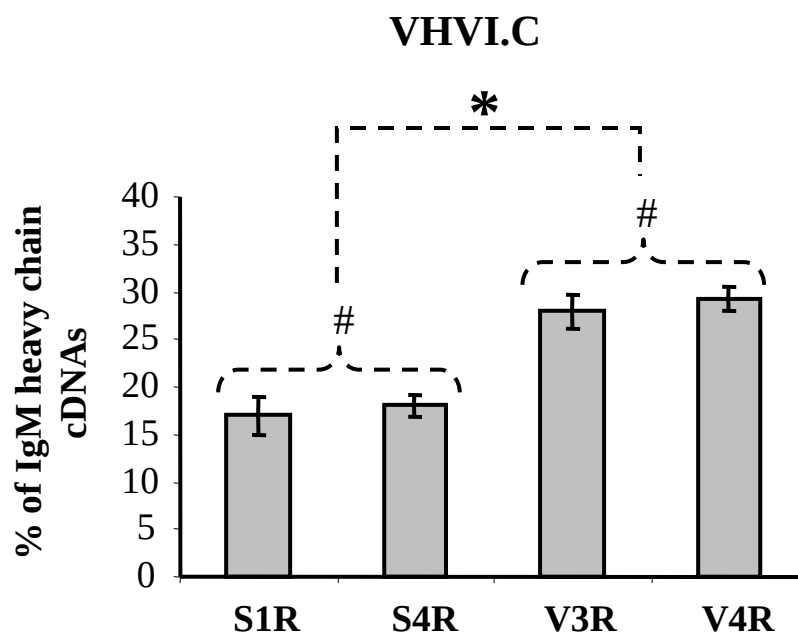


Table 1: Primers used in this work.

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

Table 2: Diversity in CDR3 regions of VHII-D-JH rearrangements.

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

D+N+P and CDR3 lengths are expressed in nucleotides.

* indicates that values obtained with unimmunized animals are statistically different from those obtained with S1R, S4R, V3R and V4R (p < 0.05).

[#] indicates that values obtained for S1R, S4R, V3R and V4R are not statistically different.

n indicates the number of sequences analyzed.

Partie 3 : Caractérisation de l'ARNm d'AID chez le pleurodèle

I. Introduction

Contrairement au xénope (amphibien anoure), les amphibiens urodèles ne semblent pas faire de commutation de classe [191](publication 2). Cette absence pourrait être due à une organisation différente des loci des gènes codant les chaînes lourdes d'anticorps, comme expliqué dans la partie 1, mais pourrait également être due à un défaut de la protéine AID. Cette dernière est en effet indispensable pour ce phénomène et celui des hypermutations somatiques. Cette protéine a déjà été identifiée chez le xénope [127] et les poissons osseux [109, 201] et est fonctionnelle chez ces animaux [202, 204]. Nous avons donc isolé et caractérisé l'ARNm d'AID chez l'amphibien urodèle *P. waltl* afin de voir si cette protéine est conservée chez cette espèce. De cette manière, nous saurons si les phénomènes induits par cette protéine sont possibles chez le pleurodèle.

II. Découverte de l'ARNm d'AID chez *P. waltl* (pAID)

Le génome du pleurodèle n'étant pas séquencé, nous avons défini des amorces dégénérées dans la région la plus conservée de l'ARNm d'AID. Ces régions ont été définies par l'alignement des séquences des ARNm d'AID de différentes espèces (le chimpanzé, l'homme, la souris, le rat, le chien, le poulet, le xénope, le poisson zèbre, le poisson chat et le fugu). Une PCR dégénérée sur de l'ADNc de rate, l'organe lymphoïde secondaire principal du pleurodèle, a ainsi permis d'isoler un amplicon de 239 pb qui présente 80% d'homologies nucléotidique avec AID de l'homme, 77% avec AID de la souris et 69% avec AID du xénope. Une traduction *in silico* de la séquence a permis d'identifier le fragment comme étant une partie du motif cytidine désaminase d'AID chez le pleurodèle. A partir de ce fragment, nous avons pu amplifier par PCR 5'RACE et 3'RACE les régions 5' et 3' de l'ARNm d'AID, respectivement. Après clonage et séquençage des produits de PCR, l'ARNm entier de la protéine AID du pleurodèle (pAID) a ainsi été isolé (figure 1A, publication 4). Par ailleurs, le clonage et le séquençage du produit de PCR 3'RACE a révélé deux séquences avec des régions 3'UTR de tailles différentes. La séquence 3'UTR la plus longue contient 3 sites consensus de polyadénylation dont un correspond à la séquence la plus courte. Ces résultats indiquent donc que l'ARNm de pAID possède au moins deux sites de polyadénylation fonctionnels. Chez le xénope, 2 transcrits d'AID de 1.3 et 2 kb sont aussi observés [127]. La différence entre ces 2 tailles (700pb) correspond à la différence observée chez le pleurodèle

(635pb). Chez la souris, deux transcrits de 1.2 et 2.4kb sont également observés [104] et la séquence 3'UTR de l'ARNm d'AID humain possède au moins 3 sites de polyadénylation [128].

III. La région 3'UTR du transcrit de pAID contient un site consensus pour le microRNA miR155

Plusieurs études ont montré que le site consensus de fixation du microRNA miR155 est présent dans la région 3'UTR de l'ARNm d'AID de plusieurs vertébrés (poissons, mammifères, xénope, oiseaux) [116, 131] (figure 1B, publication 4). La région 3'UTR la plus longue de pAID contient également ce site consensus indiquant que pAID est aussi régulé par miR155. Par contre, la forme polyadénylée courte ne possède pas ce site ce qui signifie que cette dernière échappe à cette régulation. Ce n'est pas le cas des mammifères pour lesquels toutes les formes polyadénylées d'AID sont régulées par miR155.

IV. Comparaison de pAID avec AID d'autres espèces

Afin d'être sûr que nous avons bien isolé AID et non une autre cytidine désaminase, nous avons réalisé un arbre phylogénétique à partir de la traduction *in silico* de pAID et d'autres membres de la famille des cytidines désaminases découverts dans différents organismes. Comme le montre la figure 2 de la publication 4, la séquence traduite du pleurodèle appartient bien au groupe AID. Il s'agit donc bien de l'ARNm d'AID.

La traduction *in silico* de pAID donne un produit de 195 acides aminés, soit 3 acides aminés de moins que chez les mammifères. Cette taille réduite est due à un codon start plus tardif. Néanmoins, l'alignement de pAID avec la séquence AID d'autres espèces permet de montrer que toutes les régions connues pour être impliquées dans la fonction d'AID sont présentes dans pAID (figure 3, publication 4). Les motifs NLS et NES sont hautement conservés. Le site consensus S38 de phosphorylation par la PKA (RRXS/T) est également présent mais le premier résidu Arg (R) est remplacé par un résidu Val (V). Néanmoins, il est peu probable que cette différence affecte la phosphorylation de pAID sur la Ser38, car certaines études ont montré que ce site consensus pouvait être réduit à RXS/T [287] voire absent [288]. Les acides aminés impliqués dans le site potentiel de dimérisation sont également hautement conservés. Les sites de fixation au Zn^{2+} dans la région cytidine désaminase sont présents. De plus les acides aminés qui sont mutés dans des syndrômes HIGM [105, 289-291] sont conservés dans pAID mis à part I136 qui est remplacé par une leucine. Toutefois, il est très peu probable que cette mutation affecte la fonction d'AID car

l'isoleucine et la leucine ont les mêmes propriétés, et cette mutation est également présente chez le xénope dont AID est fonctionnel [204]. Enfin, Wu *et al* [292] ont montré qu'AID interagit en C-Term avec la DNA-PKc pour prévenir les cassures double-brin dans l'ADN des lymphocytes B. Ce motif est également hautement conservé dans pAID.

L'ensemble de ces observations démontre donc que pAID est fonctionnel chez le pleurodèle. Par conséquent, il ne doit pas être responsable de l'absence de commutation de classe chez les amphibiens urodèles.

V. Expression de pAID durant le développement précoce du pleurodèle

Nous avons également voulu savoir à partir de quel stade de développement est exprimé pAID. Pour cela nous avons réalisé des PCR sur de l'ADNc d'embryons du stade 2 (4 cellules) au stade 33a (213 heures après la ponte). Des transcrits de pAID sont détectés à partir du stade 26 (110 h) (figure 5, publication 4) soit quelques stades avant l'apparition des premiers transcrits de chaîne lourde d'IgM (stade 30) mais après l'apparition des premiers transcrits de RAG1 (stade 19) [184]. Cette observation suggère donc que pAID pourrait être exprimé durant la différenciation des premiers lymphocytes B. De manière intéressante, chez l'homme, des transcrits d'AID sont également retrouvés dans le foie fœtal (lieu de différenciation des premiers lymphocytes B de l'embryon) mais pas dans la moelle osseuse adulte [128]. Cependant, ayant travaillé sur des embryons entiers, nous ne pouvons pas rejeter l'hypothèse d'une autre fonction d'AID dans le développement précoce. Cette hypothèse est renforcée par les observations de Morgan *et al* [293] qui ont observé des transcrits d'AID dans des cellules germinales embryonnaires et des cellules souches embryonnaires de mammifère, c'est-à-dire des cellules qui ont un fort potentiel de reprogrammation épigénétique. De plus, chez le xénope, AID est détecté 1 semaine avant l'apparition des premiers transcrits de RAG1. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc qu'AID ait un autre rôle durant le développement embryonnaire.

VI. Profil d'expression de pAID chez le pleurodèle adulte

Chez le xénope et les poissons, AID est exprimé dans les organes lymphoïdes secondaires mais également dans des organes non-lymphoïdes. Nous avons voulu savoir si pAID présente également ce profil d'expression. Pour cela, nous avons réalisé des PCR en temps réel sur de l'ADNc préparé à partir de différents tissus en utilisant la GAPDH comme contrôle interne. Afin de connaître les conditions idéales et l'efficacité des PCR en temps réel de ces 2 transcrits, nous avons réalisé une PCR sur une gamme de dilutions en cascade d'un

plasmide contenant l'ADNc de la GAPDH (figure 24) et d'un autre contenant l'ADNc d'AID (figure 25). L'efficacité de ces PCR sont respectivement de 96% et 108% de doublement par cycle. Ces efficacités étant très proches de 100%, nous avons utilisé l'équation du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pour normaliser nos signaux de PCR temps réel.

Un fort signal a été obtenu dans la rate (figure 4, publication 4), ce qui est normal car cet organe est l'organe lymphoïde secondaire principal du pleurodèle [294, 295]. D'autres signaux plus faibles sont présents dans le cerveau, le foie, les intestins, les poumons et les reins. Enfin, un signal très faible est observé dans le sang. Les poumons et les intestins sont des muqueuses connues pour être sensibles aux infections. L'observation de transcrits d'AID au niveau de ces tissus suggère donc que chez les vertébrés inférieurs, la maturation de l'affinité se ferait au niveau du site infectieux. D'ailleurs, des structures immunes associées aux intestins ont déjà été observées chez les urodèles [296]. Le foie est l'organe lymphoïde primaire de l'hématopoïèse chez les amphibiens et des plasmocytes périhépatiques ont été observés chez les urodèles [295] ce qui explique la présence d'AID au niveau de cet organe. Chez l'axolotl, des organes lymphomyeloïdes sont associés au cerveau expliquant également la présence de lymphocytes B [297]. Remarquons que RAG1 est aussi exprimé dans le cerveau de *P. waltl* et de la souris [184, 298]. Quant aux transcrits d'AID retrouvés dans le rein, ils peuvent refléter la possibilité d'une fonction supplémentaire de cet organe qui n'est pas encore connue chez les urodèles. Notons que chez les poissons et le xénope, des transcrits d'AID ont également été mis en évidence dans cet organe [127, 201]. Enfin les transcrits d'AID observés dans le sang peuvent provenir de lymphocytes B circulants.

VII. Epissage alternatif de pAID

Wu *et al* [129] ont montré qu'AID est épissé alternativement chez l'homme et la souris. Cet épissage concerne principalement les exons 3 et 4 chez les mammifères. De plus, les limites de ces deux exons sont conservées entre différents vertébrés (figure 1C, publication 4) ce qui laisse supposer que le mécanisme d'épissage alternatif ait été conservé au cours de l'évolution. Nous avons donc voulu vérifier cette hypothèse. Pour cela, nous avons recherché les bordures intron-exon dans l'ARNm de pAID à partir des bordures définies chez d'autres espèces. Ces bordures ont ensuite été confirmées avec les règles de Breathnach et Chambon [299]. Les bordures intron-exon semblent conservées pour pAID, mis à part que les exons 1 et 2 observés chez les mammifères sont remplacés par un seul exon chez *P. waltl* (figure 1C, publication 4). Après cette vérification, nous avons réalisé différentes PCR nichées (figure 6B à E, publication 4) mais, quelque soit les conditions de PCR, seule la forme longue du

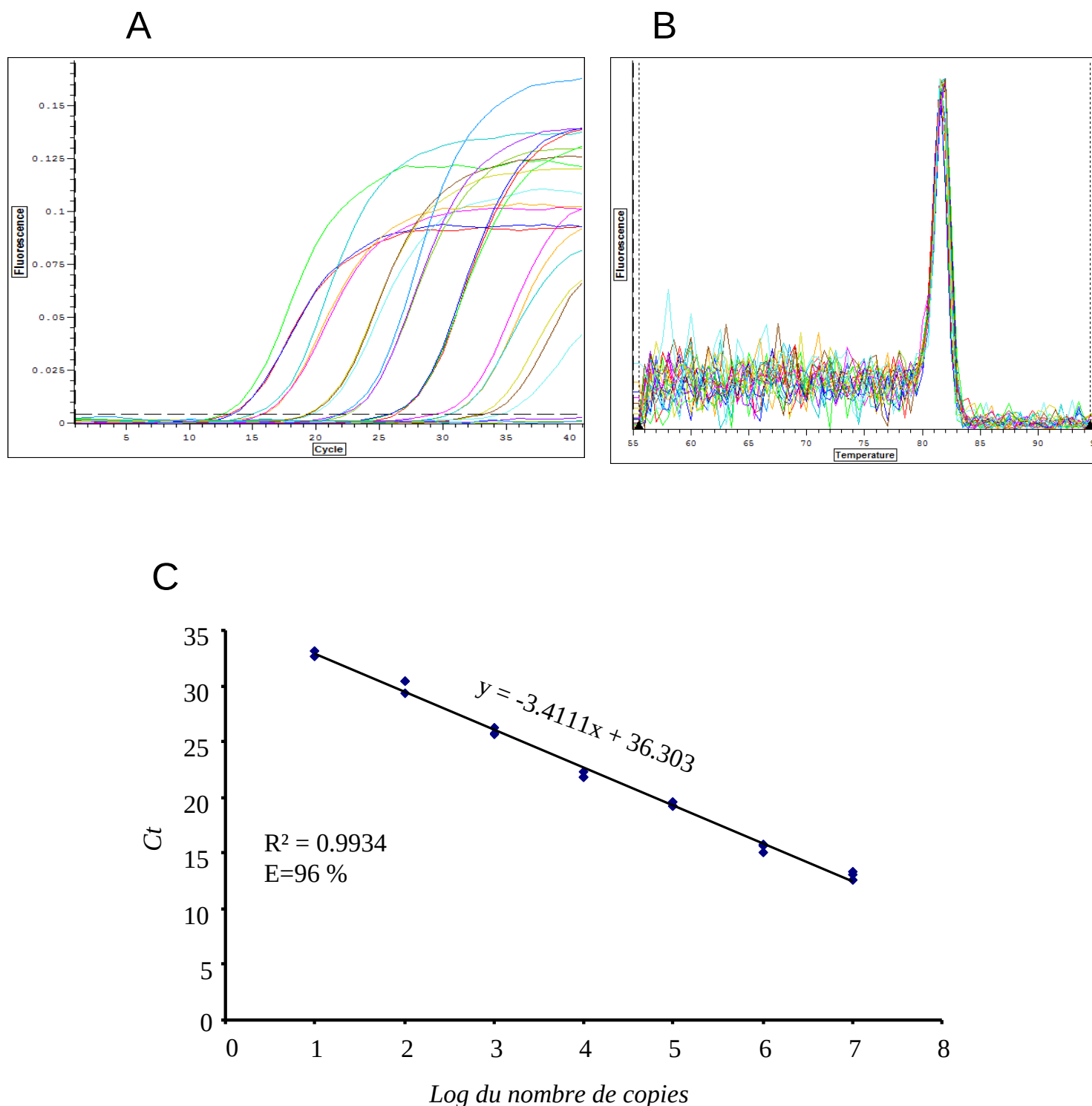


Figure 24 : PCR temps réel sur une gamme de dilutions d'un plasmide contenant l'ADNc de la GAPDH. **A)** Courbes de PCR obtenues sur une série de 7 dilutions au dixième en cascades allant de 10^7 à 10 copies/puits. Chaque dilution est réalisée en triplicata. Le niveau de fluorescence est donné en unités arbitraires (U.A.). Le seuil de fluorescence (ligne horizontale pointillée) est fixée à 0.003 U.A. de fluorescence. **B)** Pics de T_m (température de fusion) des produits de PCR obtenus à partir de chaque amplification observée dans A. Le T_m spécifique de l'amplicon de la GAPDH est de $81.66 \pm 0.24^\circ\text{C}$. **C)** Droite de régression obtenue à partir des C_t de chaque dilution en fonction du logarithme de la quantité. Le C_t est le cycle pour lequel la courbe d'amplification franchit le seuil de fluorescence. L'équation de la droite est indiquée. R^2 est le coefficient de corrélation des points par rapport à la droite. E est l'efficacité en % calculée avec la formule : $E = (10^{(-1/\text{pente})} - 1) \times 100$.

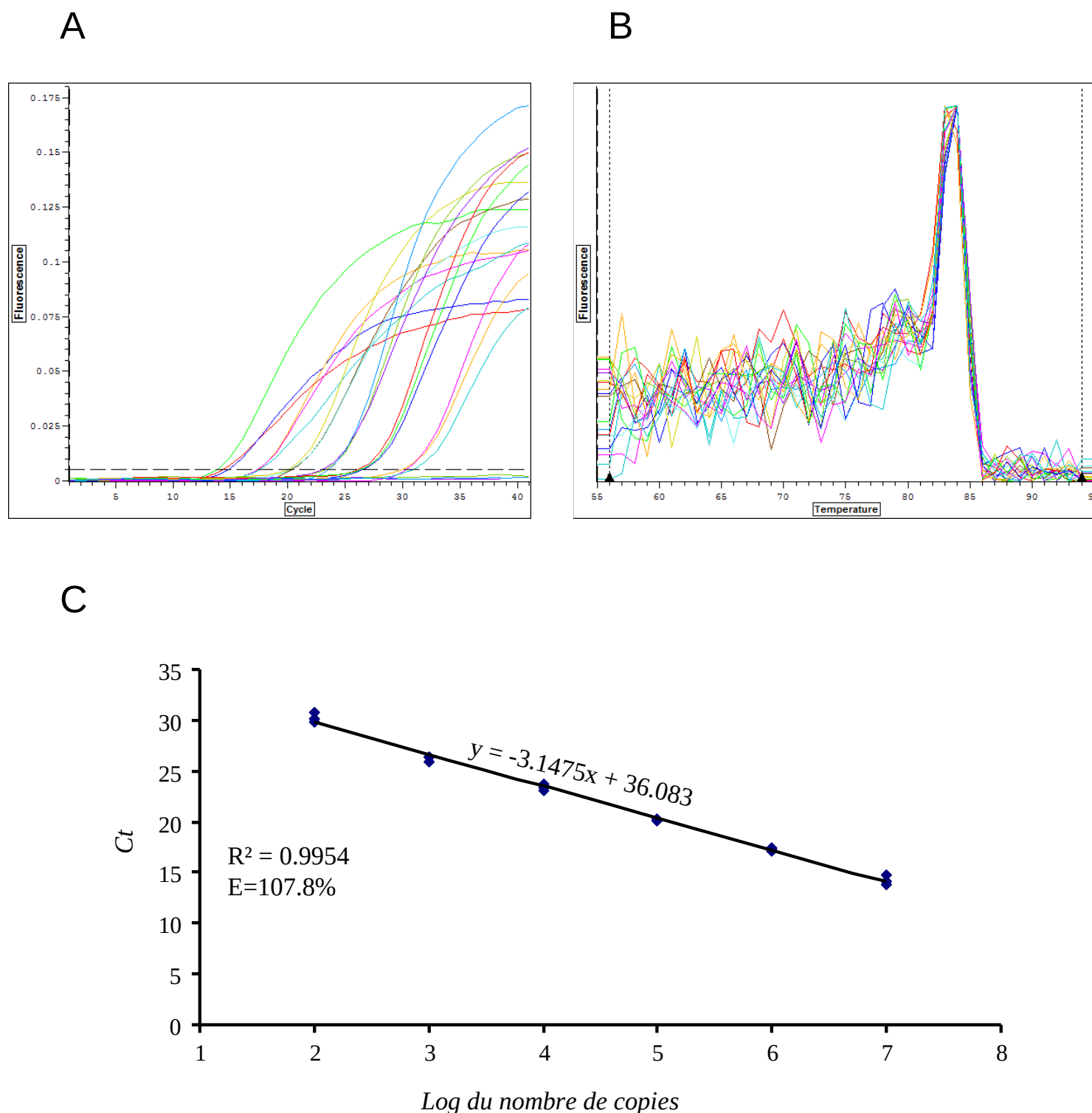


Figure 25 : PCR temps réel sur une gamme de dilutions d'un plasmide contenant l'ADNc d'AID. **A)** Courbes de PCR obtenues sur une série de 6 dilutions au dixième en cascades allant de 10^7 à 100 copies/puits. Chaque dilution est réalisée en triplicata. Le niveau de fluorescence est donné en unités arbitraires (U.A.). Le seuil de fluorescence (ligne horizontale pointillée) est fixée à 0.005 U.A. de fluorescence. **B)** Pics de T_m (température de fusion) des produits de PCR obtenus à partir de chaque amplification observée dans A. Le T_m spécifique de l'amplicon d'AID est de $83.85 \pm 0.37^\circ\text{C}$. **C)** Droite de régression obtenue à partir des C_t de chaque dilution en fonction du logarithme de la quantité. Le C_t est le cycle pour lequel la courbe d'amplification franchit le seuil de fluorescence. L'équation de la droite est indiquée. R^2 est le coefficient de corrélation des points par rapport à la droite. E est l'efficacité en % calculée avec la formule : $E = (10^{(-1/\text{pente})} - 1) \times 100$.

transcrit de pAID a été amplifiée. En se basant sur les résultats de Wu *et al* [129], nous avons défini des amorces permettant d'amplifier spécifiquement les formes épissées (figure 6A, publication 4). Cependant, cette seconde approche n'a donné aucun résultat (figure 6F, publication 4). Nous avons donc conclu qu'AID n'est pas épissé alternativement chez le pleurodèle. Notons que les amorces de PCR en temps réel ont été définies à cheval sur deux exons afin d'éviter d'amplifier d'éventuelles traces d'ADN génomique.

Toutefois, comme expliqué dans mon introduction, les formes épissées d'AID sont en très faible nombre chez l'homme et une augmentation de leur fréquence est associée à des leucémies lymphoïdes chroniques [129]. Il serait donc intéressant de savoir pourquoi ces formes n'apparaissent pas chez le pleurodèle.

Publication 4 (*molecular immunology*, 2010)

Molecular characterization of *Pleurodeles waltl* activation-induced cytidine deaminase¹

Matthieu Bascove* and Jean-Pol Frippiat^{*,2}

*Nancy-University, Henri Poincaré University. Development and Immunogenetics team, JE 2537. Faculty of Medicine. 9 Avenue de la forêt de Haye. F- 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

¹The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL nucleotide sequence database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) and have been assigned the accession numbers **FN555145** and **FN555146**.

²Correspondence: Dr. FRIPPIAT Jean-Pol. Nancy-University, Henri Poincaré University. Development and Immunogenetics team, JE 2537. Faculty of Medicine. 9 Avenue de la forêt de Haye. F- 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Fax: ++33 3 83 68 36 59. Tel: ++33 3 83 68 37 23. E-mail: Jean-Pol.Frippiat@scbiol.uhp-nancy.fr

Abstract

Activation-induced cytidine deaminase (AID) is involved in immunoglobulin affinity maturation, gene conversion and class switch recombination. This protein is therefore a major actor for the creation of the antibody repertoire. We have isolated the AID mRNA of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. This is the first AID sequence from a urodele amphibian. This mRNA encodes 195 amino acids that share 70% and 76% of similarity with *X. laevis* and human AID sequences, respectively. All consensus motifs necessary for AID functions are present suggesting that AID is functional in *P. waltl*. However, contrarily to mammals, *P. waltl* AID is encoded by only four exons and no AID splice variant could be detected in that species. We also noted that AID is predominantly expressed in the spleen, the major secondary lymphoid organ of *P. waltl*, and that the transcriptional regulation of *P. waltl* AID is partially different from the one of higher vertebrates. Furthermore, we showed that AID is expressed early during *P. waltl* embryonic development.

Keywords: activation-induced cytidine deaminase; class switch recombination; affinity maturation; B cells; immunoglobulin; humoral response; urodele amphibian.

1. Introduction

Vertebrates use various mechanisms to generate a diverse antibody repertoire: the V(D)J recombination process, gene conversion, class switch recombination (CSR) and somatic hypermutations (SHM). The last three processes require a common effector; the activation-induced cytidine deaminase (AID) which belongs to the cytidine deaminase family (Arakawa et al., 2002; Martin et al., 2002; Okazaki et al., 2002). It was originally thought that AID works as an RNA editing enzyme (Shivarov et al., 2008; Nonaka et al., 2009) but several studies suggest that this protein could act on DNA (Shen and Storb, 2004; Larijani and Martin, 2007; Larijani et al., 2007; Shen et al., 2009; Steele, 2009). In mammals, AID is mainly expressed in germinal centres where affinity maturation and class switch recombination occur. As a consequence, AID is detected mostly in secondary lymphoid organs (Muramatsu et al., 1999; Muto et al., 2000) where germinal centres are located. However, AID has also been detected in human kidney, oocytes, pancreas, embryonic germ cells and embryonic stem cells (Morgan et al., 2004; Pauklin et al., 2009). These observations suggest that AID may be involved in epigenetic reprogramming and cell plasticity.

Lower vertebrates are also able to produce a diverse antibody repertoire (Wilson et al., 1995; Cain et al., 2002; Flajnik, 2002; Stavnezer and Amemiya, 2004). AID from these species, such as the clawed toad *Xenopus laevis* and bony fishes (*Danio rerio*, *Ictalurus punctatus* and *Takifugu rubripes*), can induce CSR and SHM in mice AID^{-/-} B cells (Wilson et al., 1992; Musmann et al., 1997; Du Pasquier et al., 2000; Barreto et al., 2005; Ichikawa et al., 2006; Wakae et al., 2006). Nevertheless, affinity maturation induced by somatic hypermutations is poor in these species. Moreover, in *X. laevis* tadpoles, AID is expressed before first rearranged Ig genes suggesting that AID could have another function, different

from participating to the antibody repertoire creation, during early larval development (Marr et al., 2007).

Pleurodeles waltl is a urodele amphibian that rearranges its antibody genes like mammals (Frippiat et al., 2001). This animal expresses three Ig heavy chain isotypes that have their human counterparts (Schaerlinger et al., 2008). In this species, IgM are the most abundant antibodies. *P. waltl* IgM have the same structure than human IgM. The second isotype, called IgY, is found mostly in mucosa and is therefore the counterpart of human IgA. The third isotype, called IgP, is predominantly expressed during the larval life of *P. waltl*. IgP-expressing B cells present some similarities with mammalian B1-cells (Schaerlinger et al., 2008).

Contrarily to the anuran amphibian *X. laevis* (Mussmann et al., 1997; Du Pasquier et al., 2000) CSR is impaired in urodele amphibians, such as *Pleurodeles waltl* and *Ambystoma mexicanum*, and in bony fishes (Flajnik, 2002; Stavnezer and Amemiya, 2004) despite the fact that these species can express several antibody isotypes (Patel and Hsu, 1997; Schaerlinger et al., 2008). To better understand why CSR is impaired in urodele but not in anuran amphibians, we isolated the AID mRNA of *P. waltl*, analyzed its sequence and studied its expression in various adult tissues and during early embryonic development. Our work indicates that all functional domains are present in *P. waltl* AID. This strongly suggests that this protein is functional. The lack of class switch recombination in urodele is therefore not due to a defect in AID expression or function, even if splice variants previously described in human and mice healthy tissues could not be detected in that species. Moreover, as in *X. laevis* and the channel catfish, the expression of AID is not restricted to secondary lymphoid organs.

2. Material and methods

2.1. Animals and RNA extractions

Adult *P. waltl* and embryos were reared in our animal facilities in running tap water at 18°C. Animals were treated in accordance with the National Legislation and the Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes 86/609/EEC. Embryonic and larval developmental stages were defined according to the table published by Gallien and Durocher (1957). Ten embryos were randomly chosen for each studied developmental stage and crushed in TRIzol reagent (Invitrogen) for RNA extraction. Total RNA was also isolated from adult *P. waltl* tissues (blood, brain, heart, intestine, kidney, liver, lung, muscle and spleen) using TRIzol (Invitrogen).

2.2. Cloning and sequencing of *P. waltl* AID cDNA

One µg of spleen total RNA was reverse transcribed using random primers and MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) in a final volume of 20µl. Primers were designed in conserved regions identified by alignment of the AID sequences from *Mus musculus* ([AF132979.1](#)), *Rattus norvegicus* ([XM_575660.2](#)), *Homo sapiens* ([AB040431.1](#)), *Xenopus laevis* ([AY621657.1](#)), *Takifugu rubripes* ([AY621658](#)) and *Danio rerio* ([AY528720.1](#)). A first PCR reaction was performed with the AID5F+AID4R primers (table 1) on 100 ng of spleen cDNA using Goldstar Taq DNA polymerase (Eurogentec). The PCR program was as follows: 94°C, 1 min then 36 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 60°C, 1 min at 72°C and finally 72°C during 5 min. A nested PCR using primers AID1F and AID2R (table 1) was then performed on 1 µl of the first PCR with the same PCR program. A 239 bp PCR product was obtained and cloned using the pGEM[®]-T easy vector system kit (Promega). Plasmids containing the

inserts were purified with the NucleoSpin[®] Plasmid kit (Macherey-Nagel) and sequenced. Then, specific RACE PCR primers (AIDGSP1 and AIDGSP2; see table 1) and nested RACE PCR primers (NAIDGSP1 and NAIDGSP2; see table 1) were designed from the obtained sequence. 3' and 5' RACE cDNA were prepared from 1 µg of spleen total RNA using the BD SMART RACE cDNA Amplification kit (BD Bioscience Clontech) and MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). The first 3' and 5' RACE PCR reactions were performed with the following program: 5 cycles of 30 s at 94°C and 3 min at 72°C; 5 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 70°C and 3 min at 72°C; and 40 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 64°C and 3 min at 72°C. Nested 3' and 5' PCR reactions were then performed using the following program: 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 64°C and 3 min at 72°C. PCR products were cloned using the pGEM[®]-T easy vector system kit (Promega) and sequenced.

2.3. Sequence analysis

In silico translation was performed using the expasy translate tool (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). Sequence alignments were performed online with the Clustalw software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). The phylogenetic tree was constructed using the MEGA4 software (<http://www.megasoftware.net/>). Polyadenylation sites were predicted using polyApred (<http://www.imtech.res.in/raghava/polyapred/>) and Erpin (<http://tagc.univ-mrs.fr/erpin/>).

2.4. Real-time PCR

AID and GAPDH-specific primers used to perform real-time PCR experiments were designed using the Beacon Designer software v.7.2 (premierbiosoft) (table 1). For both transcripts, primers were designed over the junction between two exons to ensure that they could not hybridize to potential traces of genomic DNA. All Real-time PCR were performed

using the Mesa Green qPCR Mastermix (Eurogentec) in an Opticon[®] 2 real-time PCR engine (Biorad). The cycling protocol for AID was as follows: 94°C, 5 min then 41 cycles of 15 s at 94°C and 45 s at 57°C. The cycling protocol for GAPDH was as follows: 94°C, 5 min then 41 cycles of 15 s at 94°C and 45 s at 65°C. Standard curves were established for each primer pair on 7-log dilutions series of plasmid containing either the AID or the GAPDH amplicon. PCR efficiencies were then calculated using the equation: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. The AID and GAPDH primers gave respectively an efficiency of 108% and 96% of doubling/cycle. For both PCR melting curves were processed from 50 to 95°C to check the quality of the PCR and verify amplicon's melting temperature. Real-time PCR were performed on 15 ng of cDNA for AID and 1.5 ng of cDNA for GAPDH. Each PCR was performed in triplicate and repeated at least 3 times. The equation $2^{-\Delta\Delta C_t}$ was used to calculate the relative expression of AID by comparison to GAPDH. Statistical analyses were performed by ANOVA followed by a LSD post hoc test, with $p=0.05$.

2.5. PCR performed to search for alternatively spliced AID isoforms

A first PCR was performed on 1 µl of spleen cDNA using the BD Advantage[®] 2 polymerase system (Clontech) and primers AIDP1 + AIDP2 or AIDPS + AIDPAS (see table 1 and figure 6). The program was as follows : 1 min at 94°C; 40 cycles of 45 s at 94°C, 30 s at primer's melting temperature, 1 min at 72°C; 5 min at 72°C. A nested PCR with primers AIDNP1 + AIDNP2 or AIDNPS + AIDNPAS was then performed on 1 µl of the first PCR. Nested PCR using primers $\Delta E3a$ + AIDP2, $\Delta E3$ + AIDP2 or $\Delta E2-3$ + AIDP2 were also performed on the PCR products generated by AIDP1+AIDP2. PCR products were analyzed on 2% agarose gels stained with ethidium bromide.

3. Results

3.1. Cloning of the *Pleurodeles waltl* AID cDNA

To isolate *P. waltl* AID cDNA, we designed primers in conserved regions revealed by the alignment of AID mRNA from several species. We used these primers to perform PCR reactions on spleen cDNA because it has been established that AID is strongly expressed in secondary lymphoid organs. A 239 bp product was obtained and sequenced. This sequence shares 80, 77 and 69% of similarity with the corresponding regions of human, mouse and *Xenopus* AID transcripts. Moreover, a blast search performed with the *in silico* translation of that sequence showed that it contains one part of a cytidine deaminase motif suggesting that we isolated a fragment of the *P. waltl* AID cDNA. Specific primers were designed from this partial sequence to perform 5' and 3' RACE PCR and get both extremities of the *P. waltl* AID cDNA. The 3' RACE PCR generated an intense band of ~1400 bp and a weaker one of ~800 bp. The cloning of these 3' RACE PCR products allowed the isolation of two sequences of 1398 bp and 763 bp that have different 3' ends. The 5' RACE PCR produced a single band of approximately 400 bp which was also cloned and sequenced. These 3 PCR fragments overlap the first 239 bp PCR product and were therefore assembled to get two full length *P. waltl* AID cDNAs (pAID) (figure 1A). The *in silico* translation of these two *P. waltl* AID cDNAs revealed that they encode the same amino acid sequence. These transcripts differ by the length of their 3'UTR. Consequently, we searched for polyadenylation sites in the longest 3'UTR and found 3 potential loci (figure 1A). Interestingly, the second polyadenylation site matches with the 763 bp 3' RACE PCR product. These observations suggest that three pAID mRNA differing by their 3'UTR can be generated, the longest one being the most abundant since its band generated by 3'RACE was more intense.

3.2. The binding site of Mir155 is only found in the longest pAID mRNA

It was recently demonstrated that the expression of AID is regulated by the Mir155 microRNA (Dorsett et al., 2008; Teng et al., 2008). The target of Mir155 is located in the 3'UTR of AID transcripts. The 3' end of this binding site is highly conserved in mammals, birds, frogs and fishes (figure 1B). *P. waltl* AID 3'UTR contains the Mir155 binding site (figure 1B) indicating that it is also regulated by this microRNA. However, it should be noted that this binding site is preceded by two polyadenylation sites (figure 1A). This means that some pAID mRNAs, those having short 3'UTRs, will escape to Mir155 regulation.

3.3. Exon organization

We delimited AID exons' borders by the alignment of AID cDNAs from different species with their corresponding genomic sequences and checked that these borders are in agreement with the rules of Breathnach and Chambon (1981) (figure 1C). In mammals and chicken, AID is composed of 5 exons as previously described (Wu et al., 2008). However, contrarily to Wu et al. (2008), we found 5 exons in zebrafish AID as reported by Zhao et al. (2005) but the sizes of exons 2 and 3 are not the same than in mammals and birds. Interestingly, the borders between the last three exons are highly conserved in all species. We searched for these exons' borders in the pAID sequence and could only find 4 exons (figure 1C). In *P. waltl*, the first exon observed in mammals, which is very short (3 amino acids), does not exist. This *in silico* observation was confirmed by our PCR reactions performed on genomic DNA and on cDNA of *P. waltl* using primers AIDNP1 and AIDNP3 which hybridize, respectively, to areas corresponding to the 3' end of the intron located upstream exon 1 and to exon 2 of mammalian AID. These PCR reactions amplified fragments of the same sizes (data not shown) confirming the absence of the first short exon observed in other species.

3.4. Phylogenetic position of pAID

AID is a member of the cytidine deaminase superfamily. To be sure that we isolated the AID cDNA of *P. waltl* and not another cytidine deaminase, we built a phylogenetic tree using the amino acid sequences of members of this superfamily (AID, cytidine deaminase, CMP deaminase, APOBEC3G and APOBEC-1) from different organisms (figure 2). This tree shows that pAID clusters with AID from other species thereby demonstrating that the sequence identified in *P. waltl* is AID and not another cytidine deaminase. Interestingly, the pAID sequence is more related to higher vertebrates than to *Xenopus* or fish AID.

3.5. AID expression in adult *P. waltl* tissues

We used real-time PCR to quantify pAID transcripts in different adult tissues (figure 4). GAPDH and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ equation were used to normalize real-time PCR signals. Our experiments were repeated at least three times and revealed a strong signal in the spleen (figure 4) because this is the major secondary lymphoid organ of *P. waltl* (Manning, 1979; Fripiat et al., 2001; Boudarra et al., 2002). Signals about 5 times weaker than the one observed in the spleen were detected in the brain, intestine, kidney, liver and lung (figure 4). A very weak signal that was not quantified was generated by peripheral blood cells. No signal was produced when non-reverse transcribed RNA samples were used in these PCR experiments demonstrating that our qPCR were not affected by potential traces of genomic DNA (figure 4).

3.6. AID expression during early *P. waltl* development

To know when pAID is expressed during early *P. waltl* development and situate its expression as regards to the first expression of RAG1 and IgM heavy chain transcripts, we

performed PCR experiments on cDNAs prepared with total RNA extracted from embryos from stage 2 (4 cells) to stage 33a (213h after laying) of development. Our results (figure 5) indicate that the expression of pAID starts at stage 26 (110h after laying) before the appearance of first IgM heavy chain mRNAs (at stage 30) and after the beginning of the RAG1 expression whose first transcripts were detected at stage 18 (Frippiat et al., 2001). Thus, it seems that pAID is expressed in first maturing B cells. However, we cannot exclude the possibility that pAID could be expressed in other cell types because we worked on entire embryos.

3.7. pAID is not alternatively spliced

Recently, Wu et al. (2008) discovered that AID is alternatively spliced in healthy human and mouse samples. These splicing events concern exons 3 and 4 of mammalian AID (Wu et al., 2008). Interestingly, as shown above, the borders between these exons are conserved in all vertebrates suggesting that other species could also alternatively splice AID. To verify this hypothesis, we performed PCR reactions with primers designed in the 5' and 3' UTR or in the first and last exons of pAID (figure 6A). Our PCRs performed with the AIDP1+AIDP2 or AIDPS+AIDPAS primer pairs generated multiple bands (figures 6B and D). However, nested PCR using AIDNP1+AIDNP2 or AIDNPS+AIDNPAS amplified only the full length AID transcript (AID FL, figures 6C and E). Because mouse and human AID splice variants are less abundant than the full length transcript, our results could be due to a preferential amplification of the AID full length transcript during the PCR reaction. Consequently, we designed primers to specifically amplify the $\Delta E3$, $\Delta E3a$ and $\Delta E2-3$ isoforms described by Wu et al. (2008) (figure 6A). However, no amplification product was generated using this second approach (figure 6F). Taken together, these observations suggest that AID is not alternatively spliced in *P. waltl*.

4. Discussion

4.1. The absence of CSR activity in urodeles is not due to a defect in AID

In this paper, we report the first sequence of AID in a urodele amphibian. In this species AID is encoded by only four exons while mammalian, bird and fish AID are encoded by 5 exons. In mouse and human, these exons are subjected to alternative splicing that produce variants having different SHM and CSR activities. However, despite our intensive searches (see figure 6) we could not detect AID splice variants in *P. waltl*. On the other hand, splice variants represent a very low amount of AID mRNA in human and mouse and an increase of these variants correlates with cytogenetic abnormalities and clinical prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia (Wu et al., 2008).

In silico translation of the *Pleurodeles waltl* AID mRNA gives a 195 amino acids peptide. This peptide is 3 amino acids shorter than in mammals and birds because, as in *fugu*, the DSL motif located at the 5' end is missing (figure 3). All regions known to be required for AID's function are present and conserved in pAID. The nuclear localization signal (NLS) and the nuclear export signal (NES), which are very important for AID's function because they control its cellular localization and are critical for SHM (NLS) and CSR (NES), are present (Ito et al., 2004; Doi et al., 2009). Moreover, the two consensus motifs that must be phosphorylated by PKA to activate AID are present at positions 21 and 32. The first consensus phosphorylation site (R(R/H)ET) located at position 21 is highly conserved. The second consensus phosphorylation site (RRX(S/T)) at position 32 presents punctual variations in some species. In *P. waltl*, the first Arg (R) residue is replaced by a Val (V). However, some studies demonstrated that the consensus RRX(S/T) motif can be limited to RX(S/T) (Qiao et al., 2008) or that it can also be absent (Ramadan et al., 2009). The modification of the first Arg residue will therefore not affect pAID activation. The possibility that the dimerization of

AID is required for its functions is still under discussion (Wang et al., 2006; Bhagwat et al., 2008; Brar et al., 2008). However, it has been demonstrated that mutations in the putative dimerization motif (amino acids in bold in figure 3) induce a dramatic SHM activity decrease and little or no decrease in CSR activity (Shivarov et al., 2008). Interestingly, these amino acids are highly conserved between species confirming the importance of this motif. The cytidine deaminase motif of pAID contains the two conserved Zn binding sites and has the same size than the one of mammals and birds, contrarily to fishes in which this domain is longer. Our phylogenetic tree confirms that pAID is more related to higher vertebrates than to *Xenopus* or fish AID. Wu et al. (2005) showed that AID must interact with DNA-PKc to prevent DNA double-strand breaks in B cells. The consensus site involved in this interaction is well conserved in AID sequences by comparison to the site present in Ku80 (see bottom of figure 3). Finally, we located the amino acids which are mutated in HIGM syndromes (Revy et al., 2000; Kasahara et al., 2003; Ta et al., 2003; Zhu et al., 2003). These amino acids are the same in *P. waltl*, birds and mammals except F12 and I133 which are replaced by Y and L in pAID, respectively. These replacements should not affect pAID function for two reasons. First, F and Y, and I and L have respectively similar properties. Second, *Xenopus* AID, which presents the same substitutions, has a SHM activity that is comparable to the one of human AID and a lower but significant CSR activity in AID^{-/-} mouse B cells (Ichikawa et al., 2006).

These observations indicate that AID is functional in *P. waltl*. The lack of CSR activity in urodele amphibians is therefore not due to a defect in AID's expression or function. Mussmann et al. (1997) described switch regions upstream *Xenopus* C μ , C γ and C χ genes but no comparable switch regions have yet been described in urodeles and bony fishes (Flajnik, 2002; Stavnezer and Amemiya, 2004). The absence of germinal centres in the secondary lymphoid organs of cold blooded vertebrates and a less efficient T helper function could be other reasons for the absence of CSR in urodele amphibians.

4.2. Impact of the three polyadenylation sites of pAID on its transcriptional regulation

Our results show that pAID has 3 polyadenylation sites. At least 2 of them are functional because we could isolate the 3' ends of the corresponding cDNAs by RACE PCR (figure 1). Interestingly, *Xenopus* expresses also two AID transcripts whose size's difference is in accordance with our observations (~700bp in *Xenopus* vs 635 bp in *P. waltl*). In mouse, two AID transcripts of 1.2 and 2.4 kb encoding the same peptide were reported (Muramatsu et al., 1999). These two transcripts have different 3' UTR lengths, the longest one containing two polyadenylation sites. In human, the AID mRNA contains also several polyadenylation sites (Muto et al., 2000). Thus, AID transcripts having different 3' UTR and several polyadenylation sites are present in lower and higher vertebrates.

Recently, it has been demonstrated that the expression of AID is negatively regulated by the Mir155 microRNA (Dorsett et al., 2008; Teng et al., 2008). Interestingly, we could only find a Mir155 consensus binding site in the 3'UTR of the longest pAID cDNA (figure 1A) while in mouse and human AID cDNAs the Mir155 binding site is always located upstream the polyadenylation motifs. Thus, all isoforms are regulated by Mir155 in higher vertebrates while only the longest one will be subjected to this regulation in *P. waltl*. pAID mRNA with short 3'UTRs will escape to Mir155's regulation. The transcriptional regulation of AID is therefore at least partially different in higher and lower vertebrates.

4.3. AID is expressed early during *P. waltl* development

By RT-PCR, we detected AID transcripts at early developmental stages (figure 5). These transcripts appear before first immunoglobulin heavy chain mRNAs but some stages after first RAG1 transcripts (Fripiat et al., 2001). Similarly, in *Xenopus*, AID transcripts are detected one week before the appearance of RAG1 transcripts during larval development and

before the emergence of mature B cells (Marr et al., 2007) suggesting a putative role for AID during B cell development and/or in early embryonic development. The first hypothesis is supported by the fact that AID is over expressed in mouse immature B cells (Shen et al., 2008) and that AID transcripts have been observed in human foetal liver (Muto et al., 2000) where haematopoiesis begins. The second hypothesis is supported by the work Morgan et al. (2004) who detected AID transcripts in mammalian embryonic germ cells and embryonic stem cells thereby proving that AID is also expressed in tissues that undergo large scale epigenetic reprogramming during development. Since we worked on whole embryos, our study do not allow to distinguish between these two hypotheses.

4.4. AID expression is not restricted to secondary lymphoid organs

AID transcripts have been detected mostly in the spleen of *P. waltl* (figure 4). This observation is in accordance with previous studies which revealed that the spleen is the major secondary lymphoid organ in urodele amphibians (Manning, 1979; Frippiat et al., 2001; Boehm and Bleul, 2007). Signals of lower intensities were obtained with brain, intestine, mesonephros, liver and lung cDNAs (figure 4). Small amounts of AID transcripts were also detected in human kidney and pancreas (Muto et al., 2000), in channel catfish fin, intestine and kidney (Saunders and Magor, 2004) and in adult *Xenopus* intestine, kidney and liver (Marr et al., 2007).

Lungs and intestine contain mucosas which are known to be sensitive to infections. AID expression in these tissues suggests that antibody maturation occurs directly on the site of infection in *P. waltl*. This hypothesis is strengthened by the existence of gut associated immune structures in urodeles (Charlemagne, 1990a). However, these structures do not have the organization of mammalian Peyer's patches. The liver of urodeles is a transitory lymphoid organ (Charlemagne, 1990a) and perihepatic plasmocytes have been described in urodele

amphibians (Manning, 1979). Consequently, it is not surprising to detect small amounts of AID transcripts in this organ. In the Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*, some epithelial organs located close to the brain have been described as belonging to the lymphomyeloid system (Cooper, 1990) and lymphocytes have been found in the meninx of some fishes (Charlemagne, 1990b) thereby explaining why few AID transcripts could also be detected in the brain of *P. waltl*. Moreover, it should be noted that RAG1 transcripts are expressed in mouse and *P. waltl* brain (Chun et al., 1991; Frippiat et al., 2001). The mesonephros is a B-lymphopoietic site during larval development (Hansen and Zapata, 1998). The kidney is also the major site of B cell lymphopoiesis in bony fishes (Boehm and Bleul, 2007). The weak signal observed in adult mesonephros suggests that few lymphoid cells are still present in that tissue. Interestingly, the same conclusion was previously reached when we did study the expression of RAG1 (Frippiat et al., 2001).

In conclusion, this paper presents the first sequence of AID in a urodele amphibian and shows that the absence of CSR activity in these species is not due to a defect in AID expression or function. Other explanations to this lack of CSR activity could be the lack of germinal centres (as described in mammals), the absence of switch regions and a less efficient T helper function. Moreover, our work indicates that the transcriptional regulation of AID is at least partially different in higher and lower vertebrates and suggests that AID could be involved in non-immune processes during development but further experiments will be required to elucidate this function.

Acknowledgments

We thank the French National Space Center (CNES), the French Ministry of Higher Education and Research, the University of Nancy and the Lorraine area for their financial supports. M.B. is supported by a grant from the French Ministry of Higher Education and Research.

References

- Arakawa, H., J. Hauschild and J. M. Buerstedde, 2002. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science* **295**(5558), 1301-6.
- Barreto, V. M., Q. Pan-Hammarstrom, Y. Zhao, L. Hammarstrom, Z. Misulovin and M. C. Nussenzweig, 2005. AID from bony fish catalyzes class switch recombination. *J Exp Med* **202**(6), 733-8.
- Bhagwat, A. S., M. A. Carpenter and J. M. Bujnicki, 2008. Is AID a monomer in solution? *DNA Repair (Amst)* **7**(3), 349-50; author reply 351-2.
- Boehm, T. and C. C. Bleul, 2007. The evolutionary history of lymphoid organs. *Nat Immunol* **8**(2), 131-5.
- Boudarra, N., C. Fripiat, C. Dournon and J. P. Fripiat, 2002. An alternative internal splicing site defines new Ikaros isoforms in *Pleurodeles waltl*. *Dev Comp Immunol* **26**(7), 659-73.
- Brar, S. S., E. J. Sacho, I. Tessmer, D. L. Croteau, D. A. Erie and M. Diaz, 2008. Activation-induced deaminase, AID, is catalytically active as a monomer on single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst)* **7**(1), 77-87.
- Breathnach, R. and P. Chambon, 1981. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* **50**, 349-83.
- Cain, K. D., D. R. Jones and R. L. Raison, 2002. Antibody-antigen kinetics following immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a T-cell dependent antigen. *Dev Comp Immunol* **26**(2), 181-90.
- Charlemagne, J. (1990a). Immunologie des Poïkilothermes. In: Pastoret P-P, Govaerts A., Bazin H (eds) *Immunologie animale. Médecine-Sciences Flammarion*, Paris, 447-457.
- Charlemagne, J. (1990b). Immunologie des poissons. In: Pastoret P-P, Govaerts A., Bazin H (eds) *Immunologie animale. Médecine-Sciences Flammarion*, Paris, 433-446.
- Chun, J. J., D. G. Schatz, M. A. Oettinger, R. Jaenisch and D. Baltimore, 1991. The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system. *Cell* **64**(1), 189-200.
- Cooper, E.-L. (1990). Phylogénie du système immunitaire. In : Pastoret P-P, Govaerts A., Bazin H (eds) *Immunologie animale. In. Médecine-Sciences Flammarion*, Paris, 181-185.

- Doi, T., L. Kato, S. Ito, R. Shinkura, M. Wei, H. Nagaoka, J. Wang and T. Honjo, 2009. The C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase is responsible for a recombination function other than DNA cleavage in class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8), 2758-63.
- Dorsett, Y., K. M. McBride, M. Jankovic, A. Gazumyan, T. H. Thai, D. F. Robbiani, M. Di Virgilio, B. R. San-Martin, G. Heidkamp, T. A. Schwickert, T. Eisenreich, K. Rajewsky and M. C. Nussenzweig, 2008. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* **28**(5), 630-8.
- Du Pasquier, L., J. Robert, M. Courtet and R. Musmann, 2000. B-cell development in the amphibian *Xenopus*. *Immunol Rev* **175**, 201-13.
- Flajnik, M. F., 2002. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat Rev Immunol* **2**(9), 688-98.
- Frippiat, C., P. Kremarik, A. Ropars, C. Dournon and J. P. Frippiat, 2001. The recombination-activating gene 1 of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) is transcribed in lymphoid tissues and in the central nervous system. *Immunogenetics* **52**(3-4), 264-75.
- Gallien, L. and M. Durocher, 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltl* Michah. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **91**, 97-114.
- Hansen, J. D. and A. G. Zapata, 1998. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol Rev* **166**, 199-220.
- Ichikawa, H. T., M. P. Sowden, A. T. Torelli, J. Bachl, P. Huang, G. S. Dance, S. H. Marr, J. Robert, J. E. Wedekind, H. C. Smith and A. Bottaro, 2006. Structural phylogenetic analysis of activation-induced deaminase function. *J Immunol* **177**(1), 355-61.
- Ito, S., H. Nagaoka, R. Shinkura, N. Begum, M. Muramatsu, M. Nakata and T. Honjo, 2004. Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(7), 1975-80.
- Kasahara, Y., H. Kaneko, T. Fukao, T. Terada, T. Asano, K. Kasahara and N. Kondo, 2003. Hyper-IgM syndrome with putative dominant negative mutation in activation-induced cytidine deaminase. *J Allergy Clin Immunol* **112**(4), 755-60.
- Larijani, M. and A. Martin, 2007. Single-stranded DNA structure and positional context of the target cytidine determine the enzymatic efficiency of AID. *Mol Cell Biol* **27**(23), 8038-48.

- Larijani, M., A. P. Petrov, O. Kolenchenko, M. Berru, S. N. Krylov and A. Martin, 2007. AID associates with single-stranded DNA with high affinity and a long complex half-life in a sequence-independent manner. *Mol Cell Biol* **27**(1), 20-30.
- Manning, M. J., 1979. Evolution of the vertebrate immune system. *J R Soc Med* **72**(9), 683-8.
- Marr, S., H. Morales, A. Bottaro, M. Cooper, M. Flajnik and J. Robert, 2007. Localization and differential expression of activation-induced cytidine deaminase in the amphibian *Xenopus* upon antigen stimulation and during early development. *J Immunol* **179**(10), 6783-9.
- Martin, A., P. D. Bardwell, C. J. Woo, M. Fan, M. J. Shulman and M. D. Scharff, 2002. Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature* **415**(6873), 802-6.
- Morgan, H. D., W. Dean, H. A. Coker, W. Reik and S. K. Petersen-Mahrt, 2004. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* **279**(50), 52353-60.
- Muramatsu, M., V. S. Sankaranand, S. Anant, M. Sugai, K. Kinoshita, N. O. Davidson and T. Honjo, 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* **274**(26), 18470-6.
- Mussmann, R., M. Courtet, J. Schwager and L. Du Pasquier, 1997. Microsites for immunoglobulin switch recombination breakpoints from *Xenopus* to mammals. *Eur J Immunol* **27**(10), 2610-9.
- Muto, T., M. Muramatsu, M. Taniwaki, K. Kinoshita and T. Honjo, 2000. Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics* **68**(1), 85-8.
- Nonaka, T., T. Doi, T. Toyoshima, M. Muramatsu, T. Honjo and K. Kinoshita, 2009. Carboxy-terminal domain of AID required for its mRNA complex formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8), 2747-51.
- Okazaki, I. M., K. Kinoshita, M. Muramatsu, K. Yoshikawa and T. Honjo, 2002. The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature* **416**(6878), 340-5.
- Patel, H. M. and E. Hsu, 1997. Abbreviated junctional sequences impoverish antibody diversity in urodele amphibians. *J Immunol* **159**(7), 3391-9.
- Pauklin, S., I. V. Sernandez, G. Bachmann, A. R. Ramiro and S. K. Petersen-Mahrt, 2009. Estrogen directly activates AID transcription and function. *J Exp Med* **206**(1), 99-111.

- Qiao, J., O. Holian, B. S. Lee, F. Huang, J. Zhang and H. Lum, 2008. Phosphorylation of GTP dissociation inhibitor by PKA negatively regulates RhoA. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**(5), C1161-8.
- Ramadan, O., Y. Qu, R. Wadgaonkar, G. Baroudi, E. Karnabi, M. Chahine and M. Boutjdir, 2009. Phosphorylation of the consensus sites of protein kinase A on α_1D L-type calcium channel. *J Biol Chem* **284**(8), 5042-9.
- Revy, P., T. Muto, Y. Levy, F. Geissmann, A. Plebani, O. Sanal, N. Catalan, M. Forveille, R. Dufourcq-Labeolouse, A. Gennery, I. Tezcan, F. Ersoy, H. Kayserili, A. G. Ugazio, N. Brousse, M. Muramatsu, L. D. Notarangelo, K. Kinoshita, T. Honjo, A. Fischer and A. Durandy, 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* **102**(5), 565-75.
- Saunders, H. L. and B. G. Magor, 2004. Cloning and expression of the AID gene in the channel catfish. *Dev Comp Immunol* **28**(7-8), 657-63.
- Schaerlinger, B., M. Bascove and J. P. Fripiat, 2008. A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. *Mol Immunol* **45**(3), 776-86.
- Shen, H. M., G. Bozek, C. A. Pinkert, K. McBride, L. Wang, A. Kenter and U. Storb, 2008. Expression of AID transgene is regulated in activated B cells but not in resting B cells and kidney. *Mol Immunol* **45**(7), 1883-92.
- Shen, H. M., M. G. Poirier, M. J. Allen, J. North, R. Lal, J. Widom and U. Storb, 2009. The activation-induced cytidine deaminase (AID) efficiently targets DNA in nucleosomes but only during transcription. *J Exp Med* **206**(5), 1057-71.
- Shen, H. M. and U. Storb, 2004. Activation-induced cytidine deaminase (AID) can target both DNA strands when the DNA is supercoiled. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(35), 12997-3002.
- Shivarov, V., R. Shinkura and T. Honjo, 2008. Dissociation of in vitro DNA deamination activity and physiological functions of AID mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(41), 15866-71.
- Stavnezer, J. and C. T. Amemiya, 2004. Evolution of isotype switching. *Semin Immunol* **16**(4), 257-75.
- Steele, E. J., 2009. Mechanism of somatic hypermutation: critical analysis of strand biased mutation signatures at A:T and G:C base pairs. *Mol Immunol* **46**(3), 305-20.
- Ta, V. T., H. Nagaoka, N. Catalan, A. Durandy, A. Fischer, K. Imai, S. Nonoyama, J. Tashiro, M. Ikegawa, S. Ito, K. Kinoshita, M. Muramatsu and T. Honjo, 2003. AID mutant

- analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol* **4**(9), 843-8.
- Teng, G., P. Hakimpour, P. Landgraf, A. Rice, T. Tuschl, R. Casellas and F. N. Papavasiliou, 2008. MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* **28**(5), 621-9.
- Wakae, K., B. G. Magor, H. Saunders, H. Nagaoka, A. Kawamura, K. Kinoshita, T. Honjo and M. Muramatsu, 2006. Evolution of class switch recombination function in fish activation-induced cytidine deaminase, AID. *Int Immunol* **18**(1), 41-7.
- Wang, J., R. Shinkura, M. Muramatsu, H. Nagaoka, K. Kinoshita and T. Honjo, 2006. Identification of a specific domain required for dimerization of activation-induced cytidine deaminase. *J Biol Chem* **281**(28), 19115-23.
- Wilson, M., E. Hsu, A. Marcuz, M. Courtet, L. Du Pasquier and C. Steinberg, 1992. What limits affinity maturation of antibodies in *Xenopus*--the rate of somatic mutation or the ability to select mutants? *EMBO J* **11**(12), 4337-47.
- Wilson, M., A. Marcuz and L. du Pasquier, 1995. Somatic mutations during an immune response in *Xenopus* tadpoles. *Dev Immunol* **4**(3), 227-34.
- Wu, X., J. R. Darce, S. K. Chang, G. S. Nowakowski and D. F. Jelinek, 2008. Alternative splicing regulates activation-induced cytidine deaminase (AID): implications for suppression of AID mutagenic activity in normal and malignant B cells. *Blood* **112**(12), 4675-82.
- Wu, X., P. Geraldes, J. L. Platt and M. Cascalho, 2005. The double-edged sword of activation-induced cytidine deaminase. *J Immunol* **174**(2), 934-41.
- Zhao, Y., Q. Pan-Hammarstrom, Z. Zhao and L. Hammarstrom, 2005. Identification of the activation-induced cytidine deaminase gene from zebrafish: an evolutionary analysis. *Dev Comp Immunol* **29**(1), 61-71.
- Zhu, Y., S. Nonoyama, T. Morio, M. Muramatsu, T. Honjo and S. Mizutani, 2003. Type two hyper-IgM syndrome caused by mutation in activation-induced cytidine deaminase. *J Med Dent Sci* **50**(1), 41-6.

Figure legends

Figure 1:

A) Sequence of the AID mRNA of *Pleurodeles waltl* with the longest 3' UTR. Polyadenylation sites are underlined. The second site is indicated in bold because we could isolate by RACE PCR the 3' end of the corresponding cDNA. The miR155 microRNA binding site is highlighted. Double-headed arrows locate exons' limits. These limits were defined by the alignment of AID cDNAs from different species with their corresponding genomic DNA. **B)** Alignment of the miR-155 microRNA sequence with its predicted binding site in AID transcripts of various species. **C)** Schematic representation of AID in different species.

Figure 2:

Unrooted phylogenetic tree of AID and AID like proteins constructed by neighbour joining supported with 1000 bootstrap replications using the MEGA4 software and the following sequences: APOBEC1; golden hamster (AF176577), human (L25877), mouse (BC003792), opossum (AB027195), chimpanzee (WGS contig, AACZ01212655.1|+AACZ01212654.1|), rabbit (AAA56718), rat (NM_012907). APOBEC3G: human (AAH24268), chimpanzee (AAP85255), rhesus monkey (AAP85256). CD (cytidine deaminase): *B. subtilis* (U18532), *E. coli* (X63144), human (L27943), mouse (AA388666). CMP (CMP deaminase); human isoform a (NP_001012750.1), human isoform b (NP_001912.2), T4 phage (J05172), yeast (U10397). AID: mouse (AF132979.1), rat (XM_575660.2), human (AB040431.1), frog (AY621657.1), fugu (AY621658), zebrafish (AY528720.1), chimpanzee (XM_001135621.1), dog (NM_001003380.1), chicken (XM_416483.1), catfish (AY436507.1). The scale bar corresponds to the evolutionary distance.

Figure 3:

Alignment of AID sequences from various species. ∇ indicate amino acids that are mutated in HIGM syndromes. *, :, and . indicate respectively conserved amino acids, conserved amino acid substitutions and hemi-conserved amino acid substitutions. The nuclear localization signals (NLS), the dimerization domains, the cytidine deaminase motifs and the nuclear export signals (NES) are underlined. Critical amino acids are indicated in bold in these regions. Residues interacting with Zn^{2+} are indicated. The two consensus motifs phosphorylated by PKA are shown at the top of the figure. The part of the human Ku80 sequence that interacts with DNA-PKc is shown at the bottom of the figure.

Figure 4:

AID expression in adult *P. waltl* tissues quantified by real-time PCR. AID and GAPDH-specific primers were designed over the junctions between two exons to ensure that they could not hybridize to potential traces of genomic DNA. Each PCR was performed in triplicate and repeated at least 3 times. The equation $2^{-\Delta\Delta C_t}$ was used to calculate the relative expression of AID by comparison to GAPDH. Statistical analyses were performed by ANOVA followed by a LSD post hoc test with $p=0.05$. The AID signal obtained with the spleen was set as the reference. Amplification products run on agarose gels are shown below the histogram. As negative controls, the AID PCR was performed on RNA samples that were not reverse transcribed. Ø indicate PCR performed without cDNA. * means that the signal observed in the spleen is statistically different from the one obtained with the other tissues (ANOVA, $p=1.7 \times 10^{-6}$).

Figure 5:

AID expression during early stages of *P. waltl* development. Total RNA extracted from 10 embryos or larvae was reverse-transcribed. Amplifications were performed using the AID and GAPDH-specific primers designed for real-time PCR (Table 1). Developmental stages are indicated as well as the time elapsed since laying (between brackets). Arrows indicate the expression of RAG1, AID and IgM heavy chain transcripts. As negative controls, the AID PCR was performed on RNA samples that were not reverse transcribed. Ctl⁻ indicates negative controls done without cDNA. Positive controls (Ctl⁺) were made with spleen cDNA.

Figure 6:

AID is not alternatively spliced in *P. waltl*. **A)** Schematic representation of the *P. waltl* full length AID transcript (AID FL) and of the expected splice variants defined according to Wu et al. (2008). Primers used to search for these AID splice variants in the spleen of *P. waltl* are represented as horizontal arrows. $\Delta E3a$, $\Delta E3$ and $\Delta E2-3$ primers were designed on putative splicing sites to specifically amplify these variants. Sizes of the expected PCR products for each alternatively spliced form are indicated on the right. **B)** PCR performed with primers AIDP1+AIDP2 at 55°C and 60°C. **C)** Nested PCR performed with primers AIDNP1+AIDNP2 on the two PCR products shown in B. **D)** PCR performed with primers AIDPS+AIDPAS at 57°C and 62°C. **E)** PCR performed with primers AIDNPS and AIDNPAS on the two PCR products presented in D. Ø indicates negative controls performed without cDNA. **F)** Nested PCR performed with AIDP2 and the $\Delta E3a$, $\Delta E3$ and $\Delta E2-3$ primers to specifically detect the $\Delta E3a$, $\Delta E3$ and $\Delta E2-3$ variants.

Figure 1

A

gcgggggcatttgttgggtctgagtcagtcacataaatgaattgctgcagctgggtgcccagatg
ttccggggacaacacgggtgacatgagtgacacagtgcatgtgataagaagaaactaagttc
M L M K K T K F
ctgtaccactacaagaacatgcgctgggctcgctggctgccacgagacctacctgtgctac
L Y H Y K N M R W A R G R H E T Y L C Y
atcatcaaggtaagggacagcgccacttcatgctctatggacttcggctacttgcggaac
I I K V R D S A T S C S M D F G Y L R N
aagtttggctgccatgtcgagctgctcttccctgcgctacattgtgggctggaagatggac
K↓ F G C H V E L L F L R Y I V G W K M D
cctcatcgatgctaccgcacacacctgggttcacctcctggagcccctgctacgactgcgct
P H R C Y R I T W F T S W S P C Y D C A
cggcacacagccgacttccctgcaggagcaccccaacctacgtcttccgcatcttcacctc
R H T A D F L Q E H P N L R R I F T S
cgtctctacttctgtgaggagcagaacgctgagcctgagggactgcgacgcctgcacttg
R L Y F C E E Q N A E P E G L R R L H L
gccggggtccagctgggggtcatgaccttcaaaagtattacttttactgctggaatacattt
A G V Q L G V M T F K↓ D Y F Y C W N T F
gtggaacaaaggagaagaccttcaaggcttgggagggcctgcatgaaaacgctgtgctg
V E T K E K T F K A W E G L H E N A V R
ctgtccaggaagctgcgccggatccttcagtcgctctacgaggtggaagatttaagagat
L S R K L R R I L Q↓ P L Y E V E D L R D
tcattacatattttgggatttttgaggaaacaatcaatgaagaagaacttttacaaacttg
S L H I L G F
gttgataccagaacatagtgcatcaagctctgggtggaagcttaccgtgccaaaatgagag
gaaggacttattgtctcatctaatctccctactgaataaaagtgctaagtccttttttaac
aggacagtcctctaattgactgtgtggagtgcccattcttgaagaagcaagattagatga
aactgccacccctaaaagtgtgcatcttttagaaaagggtatatgtctttcagggtttct
tgccattttctgtaaacacatttttatttggattatgctatgtatacacatatgtaccat
ttaagtgtgaattagatccctgtcttggctgggtgtaaggggtctgttatgtagtgtcttgc
cagatcctctgatacattcaaaaaAGTAAAttttctctaaataatgggaacatagcaagt
tttcacaattttctttcagctacattattttttaagtgttctccctaggtgaccttgtct
ttcaaaacctgagacttcttgaacccttctgggtgctcctagtagctaaaggcgaatagc
tgGCCAAAATgatgctttgagcatgaccagtggttcacagaaaagtaaaatactcattttc
tatgataggtcttgcaaattctaacagagttaatgggataaccaaacactgaagttattg
gaaaactgtgtccacttttcaactgctccaagcagaggggtggtgagaagtatgttacagg
agcagatgaccaaaagacccttatgaagaagcattagactgcctgccctttgtgacttttcc
ttctggaagtcctaagtggactttttttcagcccttaaaatggctggagcttaagccttg
tgagctgcatgggctagaagagactgcttaaatttgctaagcactagcatcccttcgagt
tacatcttggatcgtataaagttgtaaacactcctgtttgtctttgttggttcttttta
actgctatatattttttatttggtaataaaattatgtgcttttttactacgaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

B

<i>miR-155</i>	CCCCTATCACRATTAGCATTAA
<i>P. waltl</i>	AGACCCTATGAAGAAGCATTAG
<i>H. sapien</i>	ACCAT-CTCTCCAAAGCATTAA
<i>M. musculus</i>	GCCATTCTCTCAAAAGCATTAA
<i>G. gallus</i>	AAGAAGACTTCACAAGCATTTG
<i>D. rerio</i>	TGTGTATGTACTGTAGCATTAA

C

<i>P. waltl</i>	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	
<i>H. sapiens</i>	E1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5
<i>P. troglodytes</i>	E1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5
<i>M. musculus</i>	E1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5
<i>G. gallus</i>	E1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5
<i>D. rerio</i>	E1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5

Figure 2

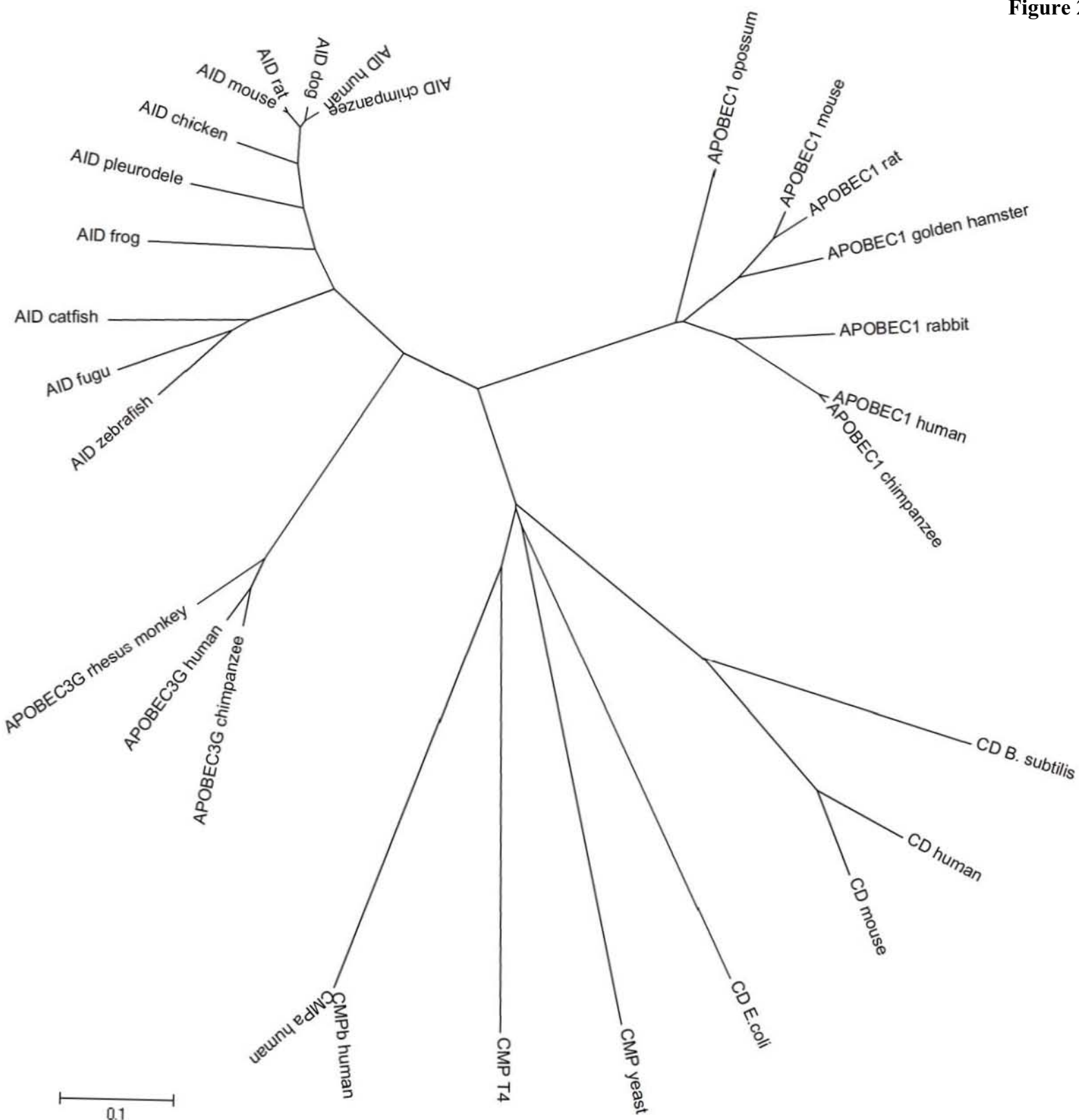


Figure 3

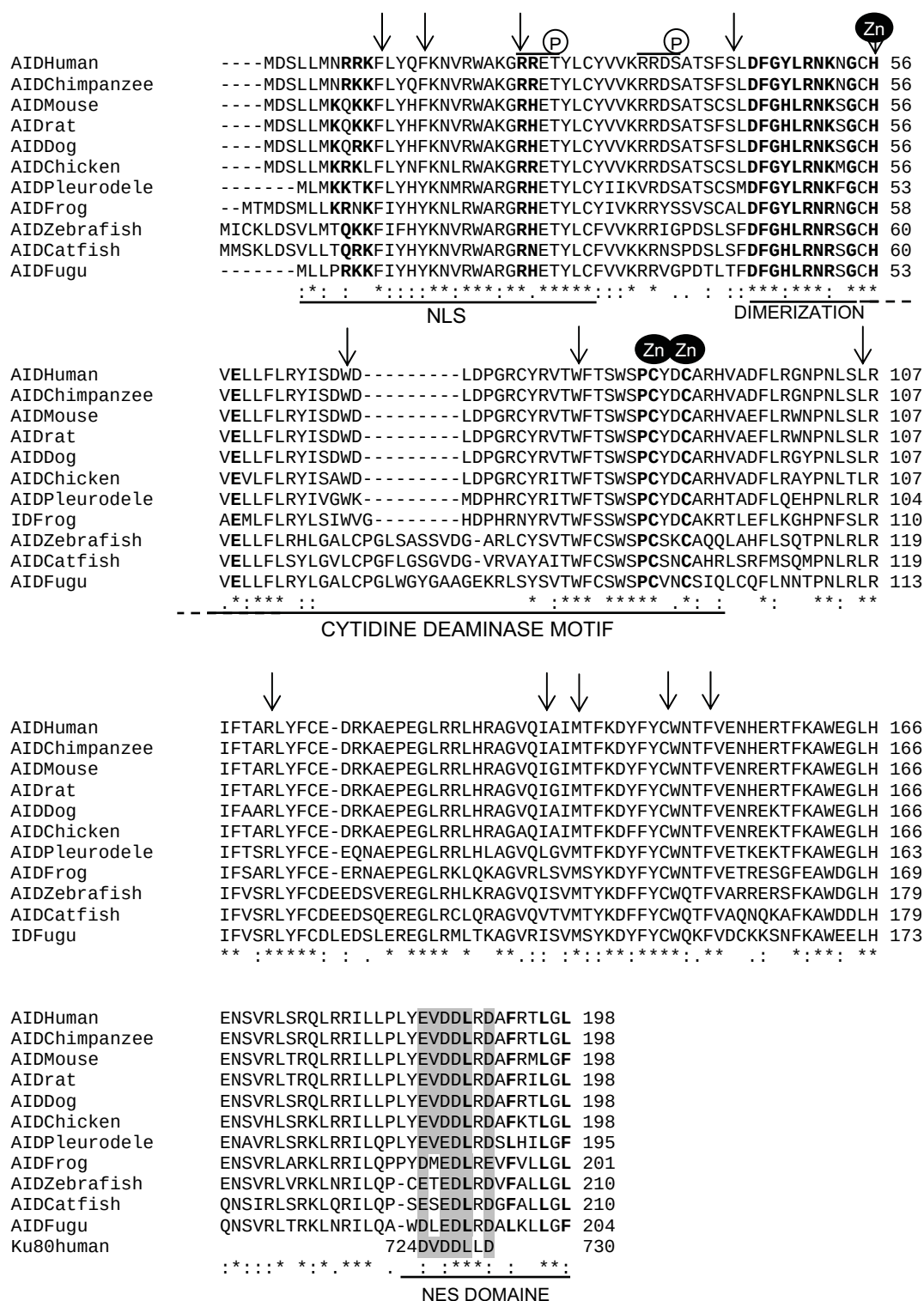


Figure 4

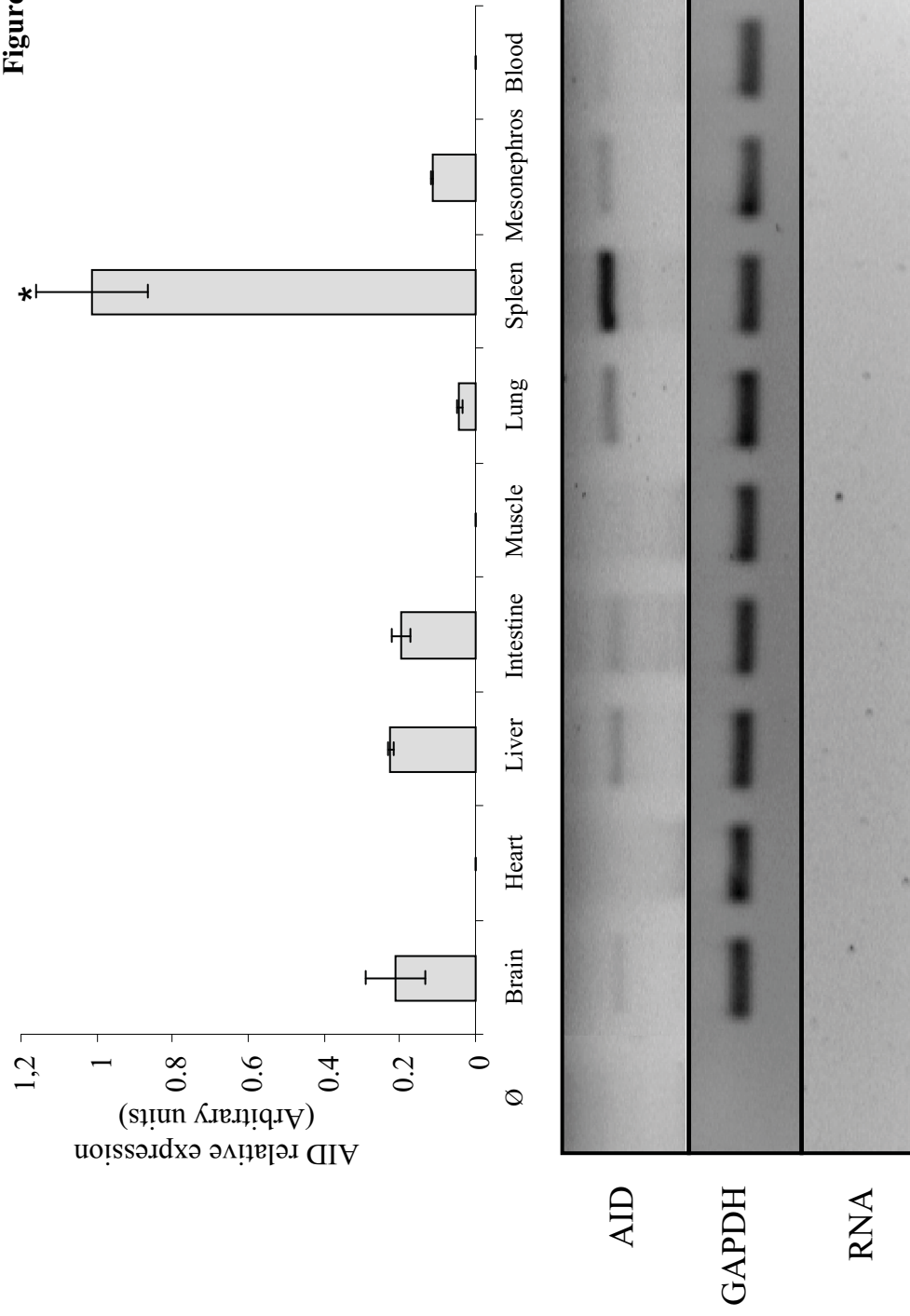


Figure 5

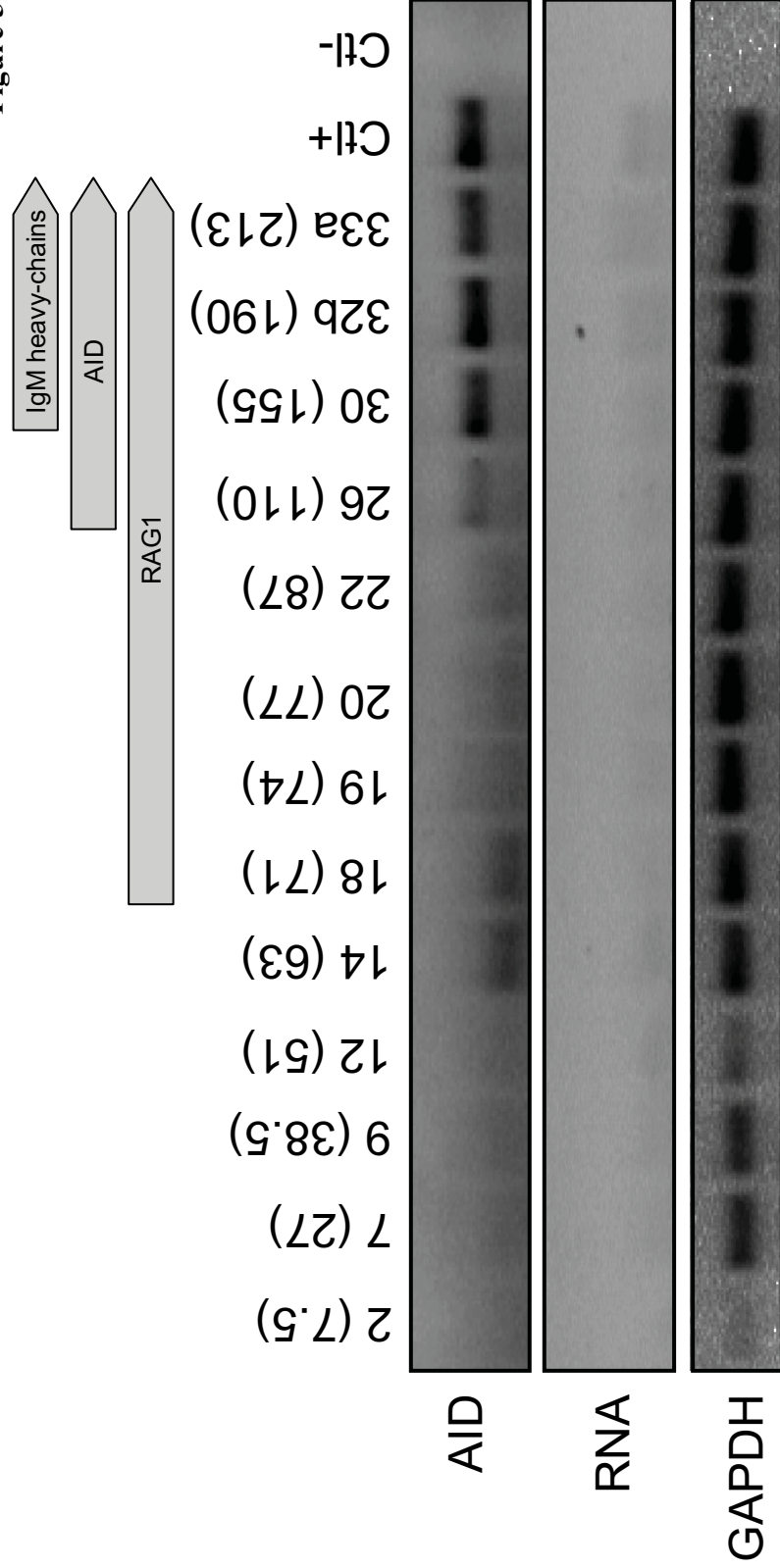
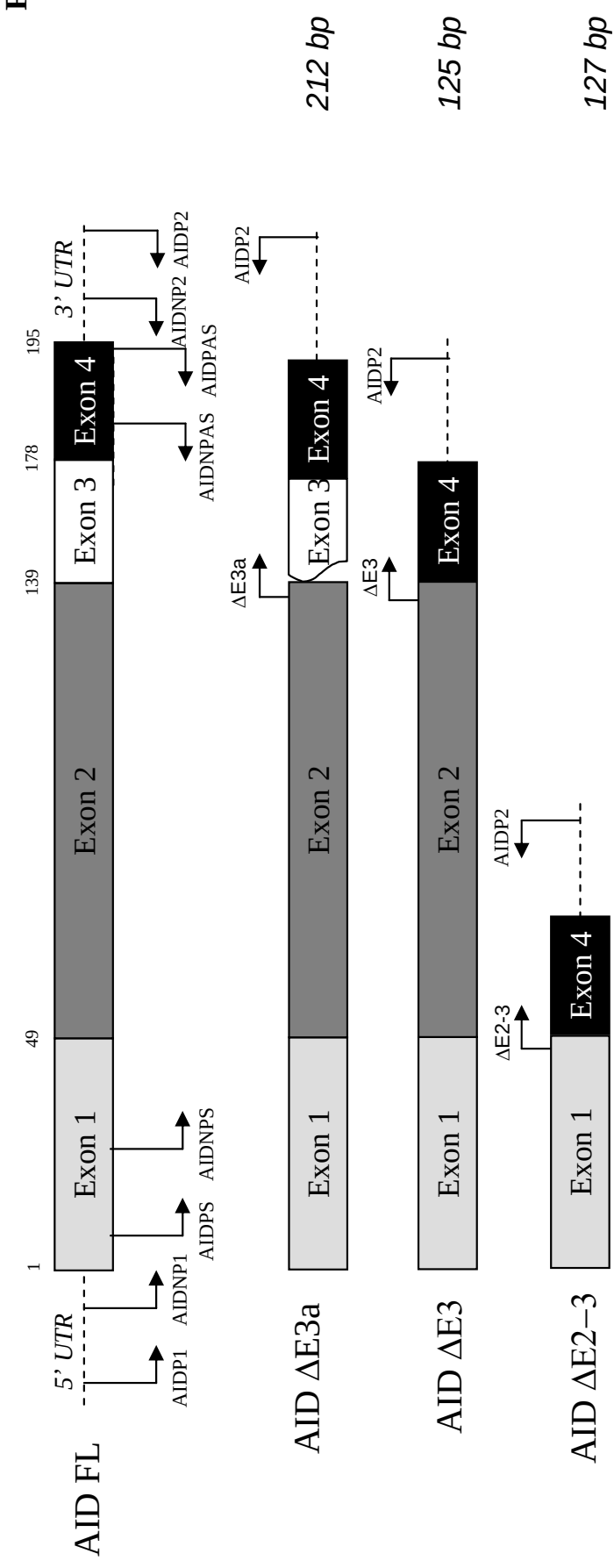
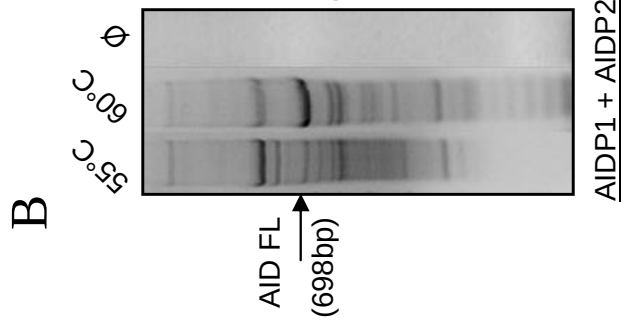


Figure 6

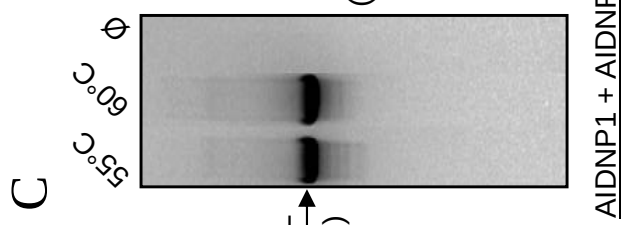
A



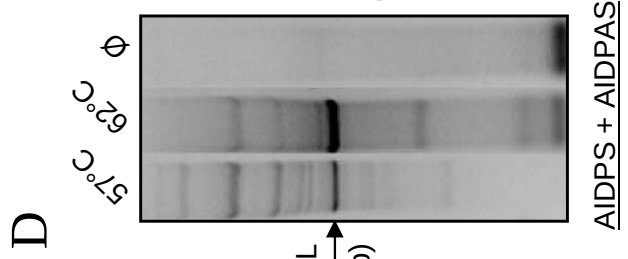
B



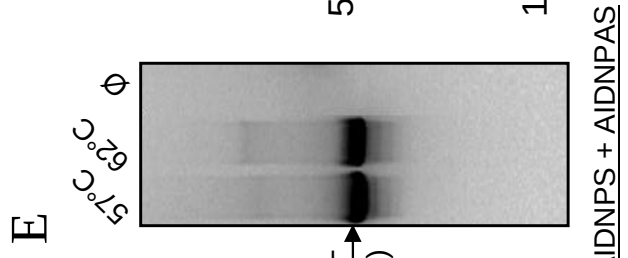
C



D



E



F

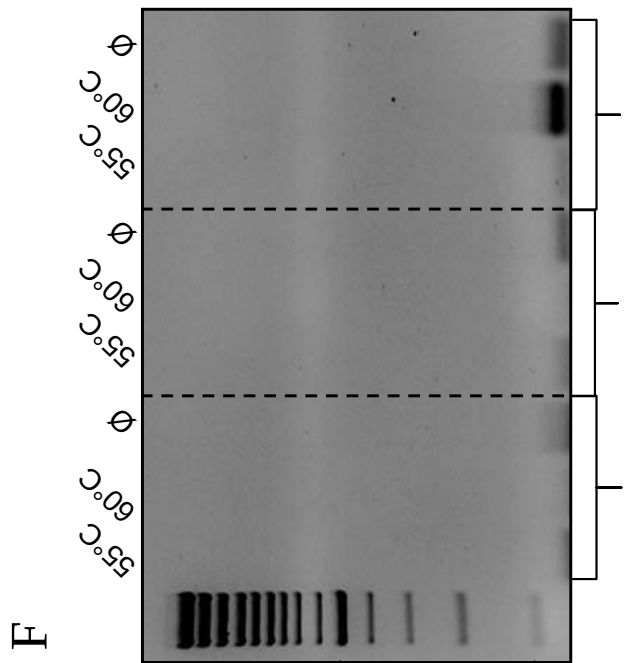


Table 1: *Primers used in this work*

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Purpose	sense	Annealing temperature (°C)
AID5F	GGGNCGGCACGAGACCTACCT	Degenerated PCR	Forward	60
AID4R	TTCCAGCAGTARAAATARTCTTT	Degenerated PCR	Reverse	60
AID2R	AAATARTCTTTGWAGSTCATGA	Degenerated PCR	Reverse	60
AID1F	WCGGRCTGGGACCTGRACCC	Degenerated PCR	Forward	60
AIDGSP1	GTCATGACCCCCAGCTGGACCCCCGGCC	5' RACE-PCR	Reverse	64
NAIDGSP1	CGGCTGTGTGCCGAGCGCAGTCGTAGC	5' RACE-PCR	Reverse	64
AIDGSP2	GCTACGACTGCGCTCGGCACACAGCCG	3' RACE-PCR	Forward	64
NAIDGSP2	CCTGCAGGAGCACCCCAACCTACGTC	3' RACE-PCR	Forward	64
AIDRTS	AGATTACTTTTACTGCTGGAATAC	Real-time PCR	Forward	57
AIDRTAS	TAGAGCGGCTGAAGGATC	Real-time PCR	Reverse	57
GAPDHdir	GAAGGTAGTAAGCAACGCCTCCT	Real-time PCR	Forward	65
GAPDHrev	CACAGCATGTACAGTGGTCATCA	Real-time PCR	Reverse	65
AIDPs	CGCCACGAGACCTACCTGT	PCR	Forward	From 57 to 62
AIDPAS	ATTGTTTCCTCAAAATCCCAAATA	PCR	Reverse	From 57 to 62
AIDNPs	TACATCATCAAGGTAAGGGACAGC	Nested PCR	Forward	60
AIDNPAS	GAATCTCTTAAATCTTCCACCTCG	Nested PCR	Reverse	60
ΔE2-3	TACTTGCGGAACAAGCCGCTCTA	Nested PCR	Forward	From 58 to 65
ΔE3a	CATGACCTTCAAAGAAACAAAGGAG	Nested PCR	Forward	From 58 to 65
ΔE3	ATGACCTTCAAAGCCGCTCTAC	Nested PCR	Forward	From 58 to 65
AIDP1	ACGTGGGTGCCAGATGTT	PCR	Forward	From 55 to 60
AIDP2	TGCACTATGTTCTGGTATCAACC	PCR	Reverse	From 55 to 60
AIDNP1	GGACAACACGGTGACATGAG	Nested PCR	Forward	60
AIDNP2	AAGTTCTTCTTCATTGATTGTTTCC	Nested PCR	Reverse	60
AIDNP3	AGCCGAAGTCCATAGAGCAT	PCR	Reverse	60

Partie 4 : Etude de la maturation de l'affinité des anticorps après un séjour de longue durée dans l'espace (non-publié)

I. Introduction

Notre étude des gènes VH utilisés par les pleurodèles immunisés lors de l'expérience Genesis a permis de montrer que les animaux immunisés dans Mir (V3R et V4R), les animaux immunisés sur Terre (S1R et S4R) et les animaux non-immunisés expriment un seul et même gène VHII (publication 2). Nous avons tiré avantage de cette observation pour étudier les hypermutations somatiques chez le pleurodèle ainsi que l'impact du séjour dans l'espace sur ce phénomène. En effet, les hypermutations somatiques n'avaient jusqu'à présent pas été décrites chez cet animal. Nous avons donc mis en évidence et caractérisé ce phénomène chez *P. waltl*. Pour cela, nous avons étudié les profils des mutations observées, cartographié ces dernières et mesuré leur fréquence sur les séquences VHII isolées lors de l'étude des gènes VH (publication 2). Ces différents critères ont alors été comparés entre les animaux immunisés sur Terre et les animaux immunisés à bord de la station Mir. Ainsi, par ces travaux nous avons pu déterminer pour la première fois l'effet d'un séjour de longue durée dans l'espace sur les hypermutations somatiques.

II. Résultats

II.1. séquençage du gène VHII utilisé pour produire les chaînes lourdes des IgM chez les animaux étudiés.

Pour étudier les mutations somatiques, il faut tout d'abord isoler et séquencer le gène VH utilisé pour produire les chaînes lourdes des anticorps spécifiques. Ceci doit être fait pour chaque animal car au sein d'une population, différents allèles d'un même gène peuvent exister. Pour les six animaux étudiés, nous avons donc isolé et séquencé le gène VHII en configuration génomique exprimé dans les chaînes lourdes des IgM en réponse à l'immunisation. Ces séquences ont été obtenues à partir d'ADN de foie et sont donc non réarrangées. De ce fait, elles ne contiennent pas de mutations somatiques.

Lors de l'étude des gènes VH, nous avons cloné et séquencé le gène VHII [273]. A partir de la séquence obtenue (référence EMBL FM877013), nous avons défini deux amorces: une dans l'intron situé en amont du peptide signal du gène VHII et une dans l'intron situé en aval du nonamère. L'utilisation de ces deux oligonucléotides nous a permis d'amplifier, à partir de l'ADN génomique de foie des animaux non-immunisés (CU1 et CU2), des animaux

immunisés au sol (S1R et S4R) ou en vol (V3R et V4R), le gène VHII qui a servi à fabriquer les chaînes lourdes des IgM. Ces produits de PCR ont été clonés et séquencés.

L'étude de ces séquences montre que les 6 codons sérine (AGC, AGT, TCA, TCC, TCG et TCT) ne sont pas répartis aléatoirement le long du gène VH (figure 26). En effet, les codons sérine AGC et AGT se situent principalement dans ou autour des régions CDR1 et CDR2 alors que les codons sérine TCN se situent majoritairement dans les domaines FR et les peptides signaux. Ce biais dans la distribution des codons sérine au sein des gènes V existe dans toutes les espèces animales qui produisent des anticorps [84]. Ces motifs font partie des cibles préférentiellement touchées par les mutations somatiques. Notons que selon l'animal, le nombre de codons sérines varie à cause d'un allélisme. Pour les animaux non-immunisés, 2 allèles ont été retrouvés.

II.2. Nature des mutations.

Afin d'identifier les mutations apparaissant sur les ADNc dérivant du gène VHII pour chaque animal, nous les avons alignés avec leur séquence génomique correspondante. Pour les animaux non-immunisés, 4 ADNc provenaient de l'allèle 1 et 17 provenaient de l'allèle 2. Nous avons alors répertorié toutes les mutations qui apparaissaient du peptide leader jusqu'au domaine CDR3 de chaque séquence d'ADNc pour les quatre animaux immunisés et les deux animaux non-immunisés (table 4 et figure 26). Nous n'avons pas répertorié les mutations dans le domaine CDR3 des séquences car, comme chez les mammifères, ce dernier est issu du réarrangement VDJ et est donc extrêmement variable [273, 300]. Chez l'animal S4R, la même mutation est apparue sur 5 séquences (figure 26). Ces 5 séquences étaient par ailleurs identiques y compris pour leur domaine CDR3. Il est donc fort probable que cette mutation ait été insérée dans un réarrangement VDJ qui a ensuite été amplifié soit par sélection clonale, soit lors de la PCR RACE. Pour l'interprétation des résultats, la séquence portant cette mutation n'a donc été comptée qu'une seule fois. Notons cependant que sur ces 5 séquences, une mutation supplémentaire était observée pour l'une d'elles. Cette séquence a donc été également retenue mais sans la mutation commune aux 4 autres. Donc sur les 17 séquences obtenues pour S4R, seules 14 ont été retenues pour la suite des analyses.

Nous avons répertorié entre 0 et 4 mutations ponctuelles par séquence VHII. Aucune délétion ni insertion n'a été observée dans les séquences. Comme le montre la table 4, 36 des 46 mutations répertoriées, soit 78%, sont des transitions (purine → pyrimidine ; pyrimidine → purine). Ce biais a également été noté chez les mammifères [80] et le xénope [190] mais il n'était pas aussi important (environ 55% chez les mammifères et 53% chez le xénope).

Table 4 : Profil des mutations apparaissant dans les ADNc VHII du peptide leader au CDR3 chez les animaux immunisés sur Terre (S1R et S4R), immunisés dans Mir (V3R et V4R) et non immunisés.

S1R (n = 20 seq.)					
de	vers				total
	A	T	C	G	
A	X				2
T		X	3		3
C	1	2	X	1	4
G	1		1	X	2
73% transitions					
27% transversions					

S4R (n = 14 seq.)					
de	vers				total
	A	T	C	G	
A	X				2
T		X	2	1	3
C	1	3	X		4
G	1		1	X	2
73% transitions					
27% transversions					

V3R (n = 22 seq.)					
de	vers				total
	A	T	C	G	
A	X				2
T		X	3		3
C	2	1	X		3
G				X	0
75% transitions					
25% transversions					

V4R (n = 21 seq.)					
de	vers				total
	A	T	C	G	
A	X	1	1	1	3
T		X	3		3
C		1	X		1
G	3			X	3
80% transitions					
20% transversions					

Non immunisé (n = 21 seq.)					
de	vers				total
	A	T	C	G	
A	X				3
T		X	3		3
C			X		0
G				X	0
100% transitions					
0% transversions					

Les chiffres en gras sont les transitions (purine ⇔ pyrimidine)

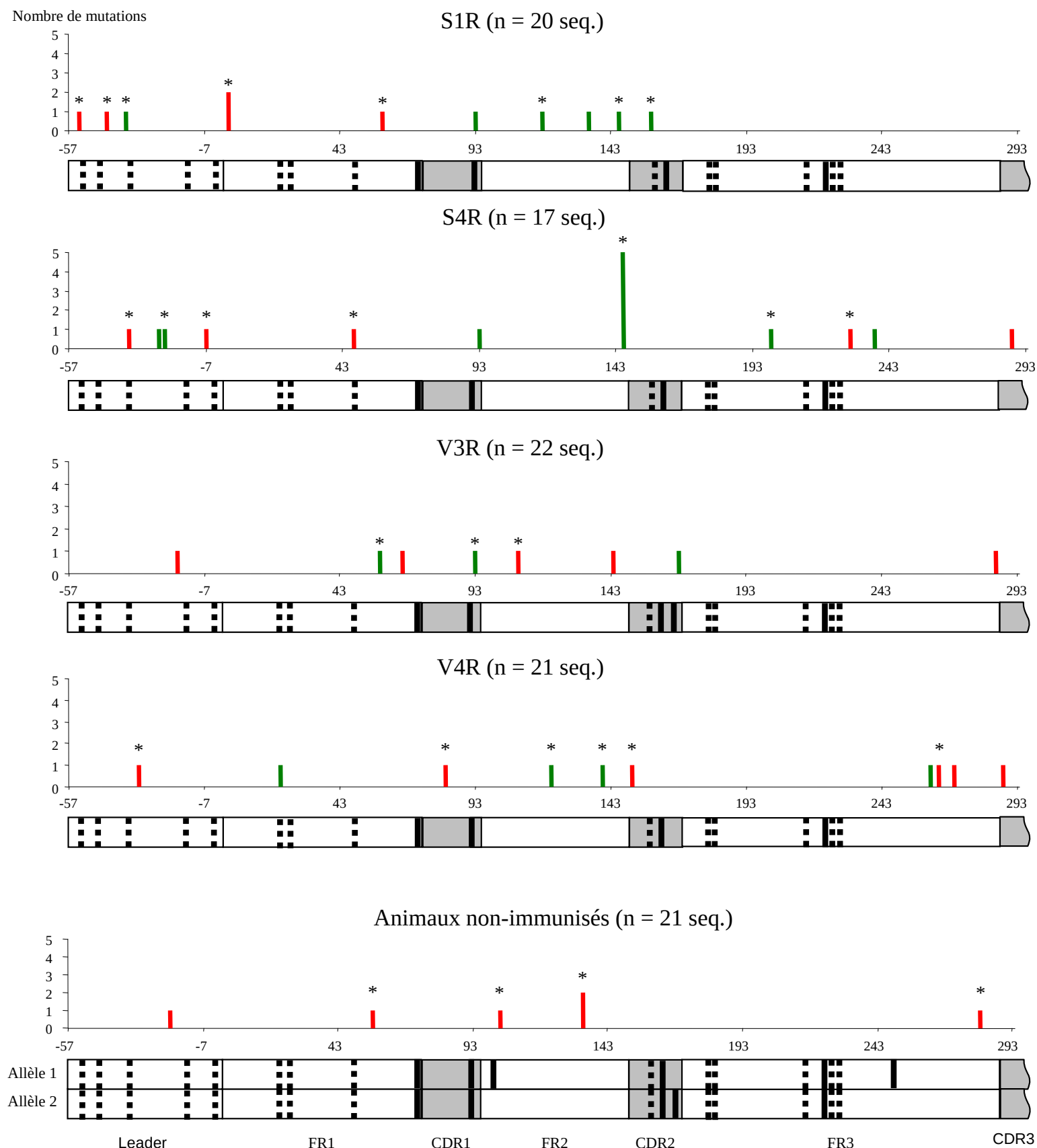


Figure 26: Cartographie des mutations apparaissant dans le gène VHIII réarrangé chez chaque animal (nombre de séquences entre parenthèses). Les barres verticales indiquent la fréquence et la position des mutations. Les mutations sur les bases G:C sont en vert et les mutations sur les bases A:T, en rouge. Les astérisques indiquent les mutations provoquant un changement d'acide-aminé. L'abscisse indique le nombre de nucléotides le long du segment VH représenté en dessous. Les boîtes grises sont les domaines hypervariables (CDR) et les boîtes blanches, le peptide leader et les régions d'ossature (FR). Les traits verticaux gras continus noirs représentent les codons serine AGC/T et les traits pointillés gras sont les codons sérine TCN.

Par ailleurs, les mutations sur les paires A:T apparaissent chez tous les animaux mais les mutations sur les paires G:C n'apparaissent que chez les animaux immunisés ce qui nous laisse penser que les mutations sur ces bases sont apparues suite à l'immunisation (figure 26).

Nous avons cartographié ces différentes mutations chez chaque animal (figure 26). Pour les quatre animaux immunisés, les mutations ne sont pas ciblées vers les régions CDR, qui contiennent pourtant les motifs préférentiels de mutations (RGYW, codons sérines AGC/AGT). Cette observation laisse supposer que les mutations générées suite à la stimulation antigénique ne sont pas sélectionnées chez cet amphibien.

Enfin, nous avons répertorié les mutations qui provoquent un changement de l'acide aminé codé. 65% de la totalité des mutations génèrent un changement de l'acide aminé (figure 26), et une seule mutation engendre un codon stop. Par ailleurs, les mutations des paires G:C et A:T peuvent provoquer toutes deux un changement de l'acide aminé et ces modifications sont présentes aussi bien dans le peptide leader que dans le gène VH ce qui amplifie l'hypothèse que les mutations somatiques ne sont pas sélectionnées chez cet animal.

II.3. Fréquence des mutations

Nous nous sommes ensuite intéressés à la fréquence des mutations observées. Nous avons tout d'abord calculé cette fréquence par rapport au nombre d'ADNc séquencés pour chaque animal en distinguant les mutations A:T des mutations G:C (table 5).

La fréquence des mutations A:T est la même pour les 4 animaux immunisés et les animaux non-immunisés ce qui amplifie l'hypothèse qu'elles ne sont pas des mutations induites en réponse à l'immunisation.

Comme expliqué ci-dessus, il n'y a pas de mutations G:C chez les animaux non-immunisés. Nous avons donc comparé la fréquence de ces mutations par rapport au nombre de séquences uniquement entre les animaux immunisés sur Terre ou en vol. Comme l'indique la table 5, cette fréquence est statistiquement plus élevée chez les animaux immunisés sur terre (S1R et S4R) que chez les animaux immunisés dans la station Mir (V3R et V4R). Ce résultat est le même si on compare les 4 animaux immunisés séparément ou si on compare les 2 conditions entre elles. Aucune différence n'a par ailleurs été notée entre les 2 animaux d'une même condition.

Cependant, quel que soit l'animal étudié, le nombre total de mutations répertoriées est faible. Nous avons donc voulu savoir si ces dernières ne sont pas des erreurs de PCR. Pour le savoir, nous avons calculé la fréquence des mutations par nucléotide pour les 4 animaux

Table 5 : Fréquence des mutations A:T et G:C par rapport au nombre de séquences VHII

Condition	Animal	Fréquence des mutations sur (*10 ⁻² /séquence)	
		A:T	G:C
Immunisé sur Terre	S1R	25.00#	30.00*
	S4R	35.71#	42.86*
	S1R+S4R	29.41#	35.29*
Immunisé dans Mir	V3R	22.73#	13.64
	V4R	28.57#	19.05
	V3R+V4R	25.58#	16.28
Non-immunisé		28.57#	0

signifie pas de différence entre les individus ou conditions (test de χ^2 , $p > 0.45$)

* signifie statistiquement différente de la fréquence chez les animaux non-immunisés (test de χ^2 , $p < 0.02$)

immunisés et pour les animaux non-immunisés. Ainsi pour chaque animal, le nombre total de mutations a été rapporté sur le nombre total de nucléotides séquencés pour leurs ADNc VHII accompagnés du peptide leader. Cette fréquence a ensuite été comparée à celle des erreurs de PCR que nous avons précédemment calculées [273] (table 6). Pour calculer la fréquence des erreurs de PCR, nous avons compté le nombre de mutations ponctuelles apparues dans la partie de l'exon C μ 1 amplifié avec les réarrangements VDJ lors de la fabrication des banques d'ADNc. En effet, la région C μ n'est pas la cible des mutations somatiques. De ce fait, les mutations observées dans C μ 1 sont forcément des erreurs de PCR. La comparaison des fréquences calculées montre que chez les animaux non-immunisés, la fréquence n'est pas plus élevée que le taux d'erreurs de PCR ce qui renforce l'hypothèse que ces mutations sont majoritairement des erreurs de PCR. Chez les animaux immunisés sur Terre, cette fréquence est plus élevée, ce qui est attendu. Par contre, chez les animaux immunisés dans la station Mir, la fréquence des mutations n'est pas suffisamment élevée pour être statistiquement différente des erreurs de PCR.

L'ensemble de ces résultats montre donc qu'il y a bien une augmentation de la fréquence des mutations somatiques chez le pleurodèle suite à une immunisation, comme ce qui est observé chez les mammifères, et ces dernières semblent être principalement des mutations G:C. Chez les animaux immunisés dans la station Mir, le phénomène des hypermutations, caractérisé par la présence de mutations G:C, a bien lieu mais la fréquence est diminuée de moitié (table 5).

II.4. Quantification des transcrits d'AID

Chez les vertébrés le phénomène des mutations somatiques dépend principalement de la protéine AID. Une augmentation de son expression est notée après une immunisation chez les mammifères [104, 120, 122, 123] et le xénope [127]. De plus, une mutation dans le gène AID peut provoquer une perte des mutations somatiques [105]. Nous avons donc voulu savoir si le niveau de transcription d'AID est modifié chez les animaux immunisés dans la station Mir. Nous avons quantifié les transcrits d'AID présents dans la rate des 4 animaux immunisés et des 2 animaux non-immunisés par RT-PCR en temps réel. Chez les animaux immunisés sur terre et ceux immunisés dans la station Mir, ce taux de transcrits est plus élevé que chez les animaux non immunisés (figure 27). L'immunisation a donc provoqué une augmentation de la transcription du gène AID. Par contre, le nombre relatif de transcrits entre les différents animaux immunisés est le même (figure 27). La transcription d'AID n'est donc pas modifiée par un séjour dans l'espace et la diminution de la fréquence des mutations somatiques n'est

Table 6 : Fréquence des mutations par nucléotides apparaissant dans le peptide leader et le gène VHII.

Condition / animal		Nombre de nucléotides séquencés	Nombre de mutations	Fréquence des Mutations (*10 ⁻⁴ mutations/pb)
Immunisé sur Terre	S1R	7016	11	15.68*
	S4R	4920	11	22.36*
	Total	11936	22	18.43*
Immunisé dans Mir	V3R	7695	8	10.40
	V4R	7367	10	13.57
	Total	15062	18	11.95
Non-immunisé		7476	6	8.03
Erreurs de PCR (exon Cp1)		12087	11	9.10

* signifie statistiquement différent des erreurs de PCR $p < 0.05$ par un test de χ^2

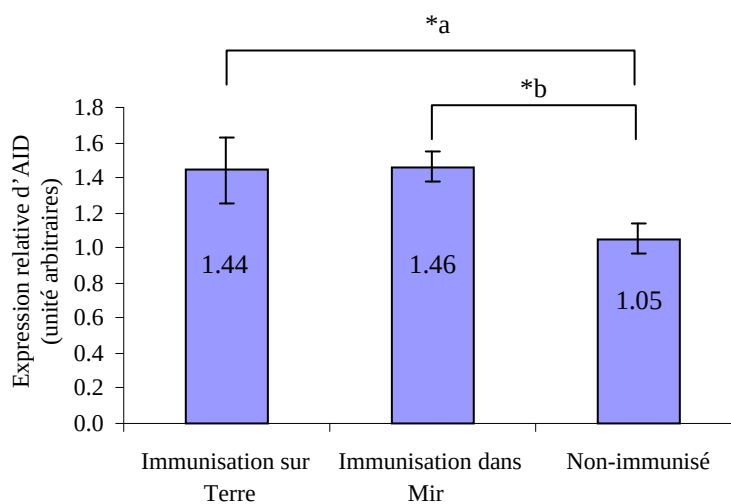


Figure 27: Analyse par PCR quantitative du taux de transcrits AID des pleurodèles immunisés sur Terre ou à bord de la station Mir. Les valeurs relatives obtenues avec les animaux non-immunisés est établie à 1. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards.
* signifie statistiquement différent par ANOVA, LSD (a, $p=0.036$; b, $p=0.014$).

pas due à un changement de la transcription de ce gène.

III. Discussion

III.1. Maturation de l'affinité des anticorps chez le pleurodèle

Les mutations somatiques permettent d'augmenter l'affinité des anticorps pour les antigènes lors d'une réponse immunitaire [301]. Ce processus a lieu dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, plaques de Peyer) et permet, chez les mammifères, d'augmenter d'un facteur 10^3 à 10^4 l'affinité des anticorps. Cependant, chez les vertébrés à sang froid, la maturation de l'affinité est faible [190, 302]. Ainsi, chez *Xenopus laevis*, c'est avec l'antigène DNP (dinitrophenol couplé à une protéine porteuse) que la plus grande augmentation d'affinité a été observée. Cependant, l'augmentation d'affinité est inférieure à 10 fois. Ce travail décrit pour la première fois le phénomène des mutations somatiques chez un autre amphibien, l'urodèle *P. waltl*.

D'après nos observations, les mutations cibleraient particulièrement les bases G:C. La même observation a déjà été notée pour les chaînes lourdes d'IgG et d'IgM du xénope [190]. Par contre, pour les Ig de mammifères, ce sont les bases G et A qui sont plus fréquemment mutées [77]. Cette différence peut dans un premier temps s'expliquer par le fait que, chez les amphibiens, les Ig mutées ne sont pas sélectionnées par l'antigène. De façon similaire, la lignée cellulaire lymphoïde de mammifère 18.81, qui est capable de muter spontanément sans stimulation antigénique, présente également un biais important pour les bases G:C [303]. Par contre *in vivo*, chez la souris, le profil des mutations somatiques dans des séquences non sélectionnées par l'antigène est proche de celui observé pour des séquences sélectionnées [77]. Il est également possible que ce biais pour les bases G:C soit du au fait que le mécanisme générant les mutations somatiques ne soit pas conservé entre les amphibiens et les vertébrés supérieurs même si la protéine AID a bien été identifiée et est surexprimée suite à une immunisation chez le pleurodèle (publication 4 et figure 27) et le xénope [127]. De plus, le fait que les G:C soient mutés indique que cette protéine est fonctionnelle. En effet, AID désamine les cytidines sur les brins transcrits et non-transcrits et de ce fait est l'initiateur des mutations sur les bases G:C [77, 303]. De plus, Ichikawa *et al* ont montré qu'AID du xénope induit des mutations avec la même efficacité que son homologue humain, dans des lignées de cellules B transfectées [204]. Par contre, suite à la désamination provoquée par AID, les voies de réparation BER (base excision repair) et MMR (mismatch repair) vont être déviées afin d'induire respectivement des mutations sur les C et les A chez les mammifères [77, 147, 148,

150, 153]. Chez des souris mutantes pour la protéine MSH2 (intervenant dans la voie MMR), un profil similaire à celui du xénope est observé [77]. Il est donc possible que la voie MMR soit intervenue dans le mécanisme des mutations somatiques plus tard dans l'évolution. Il est également intéressant de noter que chez le requin, deux profils de mutations différents existent entre les IgM et les IgNAR [210, 211]. Le profil apparaissant dans les IgM est proche de celui observé chez les amphibiens avec un biais important de bases G:C mutées alors que pour les IgNAR, le profil est proche de celui observé pour les IgG de mammifères. Cette observation soulève donc l'hypothèse de l'existence de plusieurs mécanismes de mutations chez les vertébrés à sang froid.

Les mutations des bases A:T semblent plutôt être des erreurs de PCR. Notons que dans les séquences C μ 1, il y a à la fois des mutations G:C et A:T. Cependant la composition en nucléotides n'est pas la même entre le gène VHII et l'exon C μ . En effet, le gène VHII contient autant de bases A:T que de G:C alors que dans l'exon C μ 1, il y a plus de bases G:C. La probabilité que les A:T soient mutées dans le C μ 1 est donc plus faible que dans le VHII. Nous ne pouvons de ce fait pas comparer le profil des mutations apparaissant dans le domaine C μ 1 et dans le gène VHII.

D'autre part, nos observations indiquent également que les Ig mutées ne sont pas sélectionnées par l'antigène. En effet, les mutations, qu'elles induisent un changement de l'acide aminé ou non, ne ciblent pas particulièrement les domaines CDR (figure 26). Néanmoins, certaines de nos observations suggèrent qu'une minorité des mutations sont sélectionnées. En effet, un phénomène de sélection clonale pourrait avoir lieu dans l'animal S4R pour une séquence VHII portant une mutation. De manière intéressante, cette mutation est codante et est localisée à la limite du domaine CDR2. Le mécanisme de sélection existerait donc chez les amphibiens mais ne serait pas efficace. Cette faible efficacité est probablement due au fait qu'aucun centre germinatif n'a été observé chez ces animaux jusqu'à présent alors que chez les mammifères ces centres permettent justement d'améliorer l'interaction entre les lymphocytes B et l'antigène.

Nous pensons que ces séquences amplifiées plusieurs fois sont bien le reflet d'une sélection clonale et non le résultat de plusieurs clonages d'un même ADNc de chaîne lourde même si nous ne pouvons pas complètement exclure cette dernière possibilité. En effet, 8 segments D et 8 segments JH ont été identifiés chez le pleurodèle [300]. De plus comme chez le xénope, les segments D peuvent être insérés dans les 6 phases possibles de lecture et parfois en 2 exemplaires (figure 23). Il est également possible qu'il y ait directement liaison entre un VH et un JH. De plus, comme chez les mammifères [5], des nucléotides aléatoires et des

séquences palindromiques peuvent être rajoutées au niveau des jonctions de ces segments [273]. De ce fait, la diversité de jonction au niveau des CDR3 chez cette espèce est très élevée. La probabilité de cloner plusieurs fois un même réarrangement VHDJH semble donc très faible.

Par ailleurs, la fréquence des mutations somatiques chez les animaux immunisés sur Terre (S1R et S4R) est plus élevée que chez les animaux non-immunisés ce qui démontre clairement que l'immunisation a induit le phénomène des hypermutations. Cette fréquence est de l'ordre de 1.843×10^{-3} mutations par nucléotide (table 6). Cependant elle inclut les erreurs de PCR. Si par contre, on ne considère que les mutations G:C chez les animaux S1R et S4R, on obtient une fréquence de 10^{-3} mutations par nucléotides (12/11936). Chez les mammifères la même fréquence est observée pour chaque génération de mutations [80]. Comment expliquer alors le faible nombre de mutations par séquence chez le pleurodèle ? Une possibilité serait que chez cet animal, il n'y a eu qu'une seule génération lymphocytes B suite à la stimulation antigénique. Cette idée est soutenue par la quasi-absence d'expansion clonale chez les 4 animaux immunisés, excepté S4R qui en présenterait une.

III.2. Effet du séjour dans l'espace sur la maturation de l'affinité des anticorps

Les animaux V3R et V4R sont à ce jour les seuls animaux ayant été immunisés lors d'un séjour de longue durée dans l'espace. Ces échantillons sont donc très précieux car ce sont les seuls qui permettent l'étude de la maturation de l'affinité des anticorps suite à une stimulation antigénique durant un séjour dans l'espace. Nos travaux ont montré que les pleurodèles immunisés dans Mir présentent une fréquence de mutations somatiques 2 fois moins importante que les pleurodèles immunisés sur Terre (table 5). Cette fréquence des mutations n'est pas assez élevée pour être statistiquement différente des erreurs de PCR et de la fréquence des mutations observée pour les animaux non-immunisés (table 6). Ces résultats démontrent donc qu'un séjour de longue durée dans l'espace a un effet négatif sur le processus introduisant les mutations somatiques dans les gènes réarrangés d'anticorps. Il reste maintenant à prouver que la même chose aura lieu lorsque des mammifères seront immunisés en microgravité car, comme indiqué plus haut, il se pourrait que le mécanisme générant les mutations somatiques ne soit pas complètement identique chez les amphibiens et les vertébrés supérieurs.

III.3. Causes potentielles de la diminution des hypermutations dans l'espace

Nos résultats ont montré que la diminution de la fréquence des mutations n'est pas due à un changement de la transcription d'AID chez les animaux immunisés dans la station Mir. Cependant, l'expression d'AID est hautement régulée au niveau post-transcriptionnel [116, 129, 131] et post-traductionnel [132-134, 142]. De nombreux travaux ont montré qu'AID est régulée par la voie de la PKA [100, 137, 138, 140-142]. En effet, cette protéine active AID par phosphorylation de sa Ser38, et un blocage de cette phosphorylation provoque une sévère diminution de la commutation de classe et des mutations somatiques [139]. De plus, ce motif est conservé chez de nombreuses espèces, dont les amphibiens [publication 3][205]. Par ailleurs, NFκB et CREB, deux facteurs de transcription intervenant dans l'activation des lymphocytes T, sont également phosphorylés par la PKA [304, 305]. Or un blocage de la phosphorylation de ces facteurs de transcription est observé en microgravité [267]. Il est donc possible que la phosphorylation d'AID par la PKA soit également diminuée durant un séjour en microgravité. Nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse car lors de la récupération des échantillons, les organes n'avaient pas été préparés pour des études de protéomique.

La fréquence des mutations somatiques est diminuée environ de moitié chez des souris GANP^{-/-} (germinal center-associated nuclear protein) [306]. GANP est un facteur surexprimé dans les centres germinatifs qui intervient dans la survie des lymphocytes B des centres germinatifs. Afin de savoir si la transcription de ce gène est affectée en microgravité, nous avons isolé une partie du transcrit de GANP chez le pleurodèle et l'avons quantifié par PCR temps réel chez les animaux immunisés et non-immunisés. Les résultats n'étant pas cohérents, nous n'avons pas pu conclure quant à l'implication de GANP dans la diminution des hypermutations. Cependant, plusieurs équipes ont montré qu'en microgravité réelle et simulée, différents types cellulaires, dont les lymphocytes T, entraient plus fréquemment en apoptose [307-311]. Ces observations sont dues notamment à un remaniement du cytosquelette [307, 312] et à des radiations augmentant le nombre de cassures double-brin dans l'ADN [313, 314]. D'ailleurs, des radiations équivalentes aux radiations solaires provoquent une sérieuse diminution de la production de lymphocytes B chez des souris immunisées par des érythrocytes de moutons [315, 316]. Nos résultats pourraient donc également s'expliquer par une diminution de la survie des lymphocytes B en microgravité. C'est pourquoi il serait intéressant de mesurer l'expression de facteurs de survie spécifiques des lymphocytes B tels que Bcl-2 et Bcl-x [306, 317, 318]. Notons cependant que ces facteurs dépendent de la signalisation CD40/CD40L induite par les lymphocytes T-helper. Or chez les

amphibiens urodèles, la réponse humorale médiée par les lymphocytes T est peu connue, et une thymectomie chez l'adulte n'a pas ou peu d'effet sur la synthèse d'anticorps [197, 296].

Notons enfin qu'AID semble également intervenir dans la survie des lymphocytes B en s'associant à la DNA-PKc pour réparer des cassures double-brin [292]. Or comme, il a été écrit ci-dessus, le nombre de ces dommages est augmenté durant un séjour dans l'espace. Une augmentation de l'expression de la DNA-PKc induite par les radiations pourrait peut-être perturber l'activité d'AID.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, mes travaux en immunologie fondamentale ont montré que bien que *P. waltl* et l'homme sont deux espèces très éloignées, elles présentent tout de même des similitudes au niveau de leur immunité humorale. En effet, les 3 isotypes d'anticorps présents chez le pleurodèle ont leur équivalent fonctionnel chez l'homme (publication 2). De plus, la protéine AID est conservée (publication 4) et le mécanisme des hypermutations somatiques existe aussi chez cet animal même s'il présente des différences avec celui des mammifères (partie 4). Le pleurodèle est donc un modèle valable pour étudier les effets des vol spaciaux sur l'immunité humorale.

Par ailleurs, mes résultats (publication 3) et les précédents travaux de l'équipe [272] suggèrent fortement que l'espace affecte la production d'anticorps en réponse à une stimulation antigénique. Une explication à ces observations pourrait être que les vols spatiaux affectent l'activation des lymphocytes B. Afin de vérifier cette hypothèse il serait intéressant d'étudier l'activation des cellules B lors d'un vol spatial. Pour cela, nous pourrions mettre en culture des splénocytes de souris et les stimuler durant un séjour en microgravité avec des mitogènes ou des anticorps spécifiques. Une stimulation par du LPS ou des oligonucléotides CpG (cytosine poly-guanosine) activeraient les cellules B *via* les récepteurs Toll-like alors qu'une stimulation par un anticorps anti-BCR ou encore un ligand du récepteur CD40 activeraient les lymphocytes B *via* la voie du BCR. Les cellules seraient fixées 48h après activation. Ainsi, après leur retour sur Terre, nous pourrions mesurer les effets du vol spatial sur la prolifération cellulaire par cytométrie de flux en utilisant des marqueurs comme CD19, B220 ou CD40. Ces marqueurs caractéristiques des lymphocytes B permettront ainsi d'estimer le nombre de ces cellules avant et après activation. Avec la même méthode nous pourrions quantifier les cytokines TH1 et TH2 afin de connaître leur implication dans les éventuels changements observés sur la prolifération cellulaire. La quantification de l'IL21 serait également intéressante car cette cytokine, principalement sécrétée par les lymphocytes T helper folliculaires, joue un rôle clé dans l'activation et la différenciation des lymphocytes B [124]. Enfin, il serait intéressant d'étudier l'expression génique de facteurs intervenant dans l'activation des lymphocytes B tels que les membres du complexe NFκB, HOX-C4 et Pax5.

Par ailleurs, comme présenté dans la partie 4 de ma thèse, une diminution de la fréquence des hypermutations somatiques a été observée chez les animaux immunisés à bord de la station Mir. Ceci peut s'expliquer par une diminution de la survie des lymphocytes B. Il

serait donc également intéressant de quantifier l'expression des facteurs antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-x spécifiques des lymphocytes B.

Enfin, il serait intéressant de réaliser de nouvelles expériences d'immunisation en conditions spatiales afin de confirmer mes résultats. Dans ce contexte, nous pourrions immuniser des têtards de xénope avant le décollage afin que la production d'anticorps ait lieu durant le séjour en microgravité. Comme pour le pleurodèle, les têtards de xénopes sont autonomes et se développent dans l'eau. Ce type d'expérience demande donc peu d'entretien de la part des astronautes. Notons que le xénope présente des avantages supplémentaires par rapport au pleurodèle car son immunité humorale a déjà été bien caractérisée [127, 189, 190, 204, 207, 278, 302]. De plus, des immunisations de têtards ont déjà été réalisées avec succès par l'équipe du Professeur Du Pasquier [319]. Nous pourrions donc immuniser des têtards de xénope avec un protocole existant déjà comme une injection de DNP-KLH (dinitrophenylated keyhole limpet hemocyanin) en intra-péritonéale. Notons que la production de chaînes lourdes d'anticorps provoquée par cet antigène est bien caractérisée, notamment en ce qui concerne l'utilisation des gènes VH [320]. Après un séjour de 3 à 4 semaines en microgravité, les têtards seraient fixés et nous pourrions alors leur faire subir les mêmes études que celles effectuées durant ma thèse. Dans un premier temps, nous pourrions mesurer l'expression des deux isotypes les plus abondants chez le xénope, qui sont les IgM et IgY, au niveau transcriptionnel (par PCR en temps réel) et au niveau traductionnel (par western blotting). Par PCR en temps réel, nous pourrions également étudier la façon dont les différentes familles de gènes VH et segments JH sont utilisés pour fabriquer les chaînes lourdes de ces deux isotypes majoritaires. De cette manière, nous saurons s'il y a une différence dans l'utilisation de ces éléments entre les animaux immunisés dans l'Espace et ceux immunisés sur Terre. Notons que chez des têtards immunisés sur Terre, cette immunisation provoque principalement l'expression de gènes de la famille VHI associés à un élément JH3 [320]. Les têtards de xénope présentent également l'avantage de réaliser des hypermutations somatiques [320]. Une analyse comparable à celle qui a été réalisée dans la partie 4 de cette thèse pourra donc être réalisée en se concentrant sur les gènes de la famille VHI afin de confirmer mes résultats. De plus, comme expliqué dans mon introduction, le phénomène de commutation de classe existe chez le xénope. Il serait donc intéressant de l'étudier chez les têtards immunisés au sol ou en vol. Pour cela, il faudrait fixer des têtards à différentes dates durant leur séjour dans l'espace afin de savoir si l'apparition des IgY est retardée en microgravité. De plus, chez le xénope, la réponse immunitaire humorale médiée par les lymphocytes T est plus proche de celle des

mammifères [296]. Cet avantage permettra d'étudier des facteurs dont l'activation dépend des lymphocytes T comme les facteurs de survie Bcl2 et Bcl-X.

Si les résultats observés chez le xénope vont dans le même sens que mes résultats, nous pourrons alors supposer que ces modifications apparaissent également chez l'homme.

ANNEXE

Cette annexe contient un chapitre du rapport au COSPAR 2008 (space science research in France) que j'ai rédigé. Ce chapitre résume les résultats fondamentaux obtenus par l'équipe Développement et Immunogénétique ainsi que les expériences spatiales développées par le groupe. Cet article présente notamment l'expérience Amphibody à laquelle j'ai participé durant le début de ma thèse.

Effects of spaceflight on the humoral immune response

Effets des vols spatiaux sur la réponse immunitaire humorale

M. Bascove¹, N. Gueguinou¹, C. Huin-Schohn^{1, 2}, N. Touche¹, J.-L. Bueb², E. Tschirhart², C. Dournon¹ and J.-P. Fripiat^{1*}.

¹, Nancy-Université, EA 3442, groupe Développement et Immunogénétique, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

², Université du Luxembourg, Unité de Recherche en Sciences de la Vie, Luxembourg.

* **Contact** : Dr J.-P. Fripiat, Nancy-Université, EA 3442, Boulevard des Aiguillettes, BP 239. F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France.
Tel: +33 3 83684494. Fax: +33 3 83684196. E-mail: Jean-Pol.Fripiat@scbiol.uhp-nancy.fr

ABSTRACT

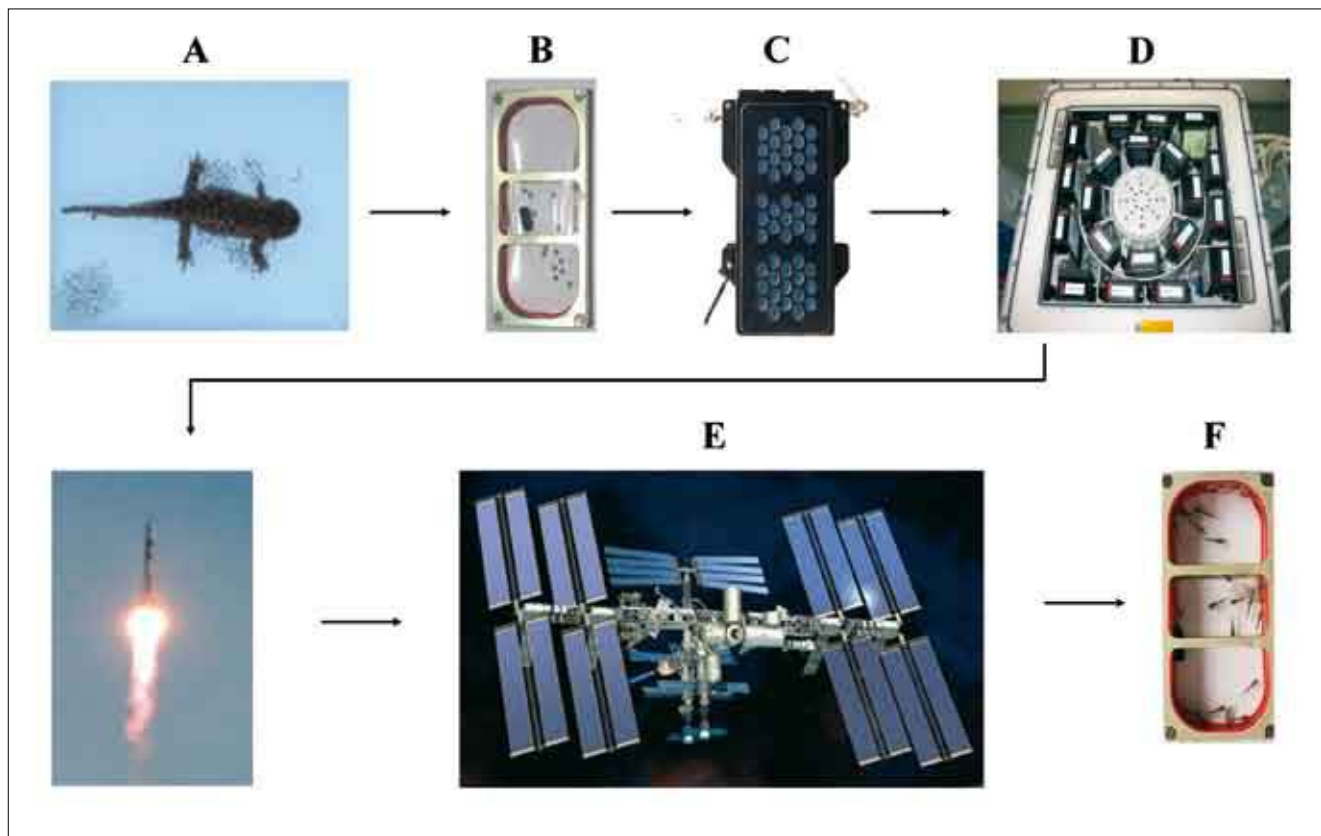
Understanding why the immune system is depressed during spaceflight is of obvious importance for future deep space missions. Using the amphibian *P. waltl* as a model, we showed that a long-term spaceflight affects the distribution of B lymphocytes and the humoral response. Our current objective is to determine the effects of spaceflights on the machinery which creates a highly diverse antibody repertoire required for the recognition of the numerous antigens present in the environment.

Il est important de comprendre pourquoi le système immunitaire est déprimé durant un vol spatial pour préparer les missions de longues durées. En utilisant l'amphibien *P. waltl*, nous avons montré qu'un séjour dans l'espace affecte la distribution des lymphocytes B et la réponse humorale. Notre objectif actuel est de déterminer les effets d'un vol sur la machinerie qui permet de créer un répertoire diversifié d'anticorps requis pour reconnaître les antigènes présents dans l'environnement.

Returning astronauts have experienced altered immune function and increased vulnerability to infection during spaceflights dating back to Apollo and Skylab missions. As plans for long-term missions continue to develop, it is imperative that we understand the effects of spaceflights on the immune system because alterations of immunity could seriously impair the ability of the host to deal with infections.

We have analyzed the effects of spaceflight on the humoral response induced by an antigenic stimulation [1]. We used the amphibian *Pleurodeles waltl* (Fig. 1A) to perform this experiment since this animal was successfully used during previous space experiments [2]. Moreover, our ground based studies indicated that it is a good model to delineate the effects of spaceflight on the humoral response. Indeed, we showed that this animal uses the same V(D)J recombination machinery than humans to produce its functional antibody genes [3]. We also showed that it possesses three isotypes of

antibodies, IgM, IgY and IgP, which have their human physiological counterparts [4]. IgM are multimeric molecules as in other vertebrates and represent the most abundant isotype throughout the life of *P. waltl*. IgY are the physiological counterpart of mammalian IgA. IgP-expressing B cells present some similarities with mammalian B1-cells and could constitute a first line of defence for *P. waltl* larvae. Finally, we showed that *P. waltl* possesses at least 10 families of VH genes, 8 JH and 8 D segments, and that this animal uses these genes and segments in the same way as humans to create its functional antibody heavy chains genes. We also characterized antibodies produced by another amphibian, *A. mexicanum*, because its development is slower than the one of *P. waltl*. It could therefore constitute an interesting model to study key steps of the immune system ontogenesis [5]. These ground studies were also required for the analysis of the spaceflight-induced modifications of the humoral response.



(Fig.1) The Amphibody experiment. *P. waltl* embryos (A) were placed in miniaquaria (B) that were inserted in Type 1 containers (C). These containers were loaded in the Kubik incubator (D) and flown for 10 days (E). At landing, larvae that produce antibodies were recovered (F).

In a first attempt to determine if the humoral response of *P. waltl* is affected by spaceflight conditions, we performed the Genesis experiment during the Perseus mission. During this mission, adult *P. waltl* stayed during 5 months on board the Mir space station and were immunized [1]. We noted that 10 days after landing, the level of IgY heavy chain transcription was at least three times higher in the spleens of the animals immunized on board Mir. A modification of the distribution of IgY-producing B lymphocytes in *P. waltl* exposed to microgravity is likely the explanation of this observation. We also noted that the variable domains of specific IgM heavy chains are encoded by genes of the VHII and VHVI families. However, the VHII and VHVI families are found, respectively, in 28% and 58% of IgM heavy chains of animals immunized on Earth and in 61% and 24% of IgM heavy chains of animals immunized on board Mir [1]. These changes were unlikely due to an infection of the animals in the space station because they were kept in separate boxes. They rather reflected the impact of the flight on the immune response against the antigen. In conclusion, this experiment suggests that a long-term spaceflight affects the humoral response and modifies the distribution of B lymphocytes in the organism.

Our current objective is to determine if the V(D)J recombination machinery, which creates a highly diverse antibody repertoire, is altered under spaceflight conditions. To answer this question, we performed the Amphibody experiment on board the ISS from the 30th of March up to the 9th of April 2006 (Fig.1). We previously showed that the first IgM heavy chain transcripts of *P. waltl* appear on day 5-6 after laying [3]. Therefore, if *P. waltl* embryos are flown before these dates, the V(D)J recombination process will occur under altered gravity conditions. From a practical point of view, 3-day-old *P. waltl* embryos that do not yet recombine their antibody genes and segments were flown. These embryos developed during 10 days on board the ISS. At landing, we recovered larvae which have antibodies. These larvae were sacrificed either as soon as possible after landing or 25 or 39 days later to determine if the potential modifications are reversible.

● References :

- [1] Boxio R., et al. (2005) J. Appl. Physiol. 98: 905-910.
- [2] Dournon C. (2003) Adv. Space Biol. Med. 9:101-31.
- [3] Fripiat C., et al. (2001) Immunogenetics 52: 264-275.
- [4] Schaerlinger B., et al. (2008) Mol. Immunol. 45: 776-86.
- [5] Schaerlinger B. & Fripiat J.-P. (2008) Dev. Comp. Immunol. 32: 908-915.

RÉFÉRENCES

1. Collis, A.V., Brouwer, A.P., Martin, A.C. (2003) Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J Mol Biol* **325**, 337-54.
2. Johnson, G., Wu, T.T. (1998) Preferred CDRH3 lengths for antibodies with defined specificities. *Int Immunol* **10**, 1801-5.
3. Culler, S., Hsiao, T.R., Glassy, M., Chau, P.C. (2004) Cluster and information entropy patterns in immunoglobulin complementarity determining regions. *Biosystems* **77**, 195-212.
4. Combriato, G., Klobeck, H.G. (2002) Regulation of human Ig lambda light chain gene expression by NF-kappa B. *J Immunol* **168**, 1259-66.
5. Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575-81.
6. Chowdhury, D., Sen, R. (2004) Regulation of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements. *Immunol Rev* **200**, 182-96.
7. Matsuda, F., Ishii, K., Bourvagnet, P., Kuma, K.I., Hayashida, H., Miyata, T., Honjo, T. (1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 2151-2162.
8. McBride, O.W., Battey, J., Hollis, G.F., Swan, D.C., Siebenlist, U., Leder, P. (1982) Localization of human variable and constant region immunoglobulin heavy chain genes on subtelomeric band q32 of chromosome 14. *Nucleic Acids Res* **10**, 8155-70.
9. McBride, O.W., Hieter, P.A., Hollis, G.F., Swan, D., Otey, M.C., Leder, P. (1982) Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes. *J Exp Med* **155**, 1480-90.
10. Malcolm, S., Barton, P., Murphy, C., Ferguson-Smith, M.A., Bentley, D.L., Rabbitts, T.H. (1982) Localization of human immunoglobulin kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 4957-61.
11. Erikson, J., Martinis, J., Croce, C.M. (1981) Assignment of the genes for human lambda immunoglobulin chains to chromosome 22. *Nature* **294**, 173-5.
12. Alt, F.W., Oltz, E.M., Young, F., Gorman, J., Taccioli, G., Chen, J. (1992) VDJ recombination. *Immunol Today* **13**, 306-14.
13. Nussenzweig, M.C., Shaw, A.C., Sinn, E., Danner, D.B., Holmes, K.L., Morse, H.C., 3rd, Leder, P. (1987) Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu. *Science* **236**, 816-9.
14. Kitamura, D., Rajewsky, K. (1992) Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* **356**, 154-6.
15. Zachau, H.G. (1993) The immunoglobulin kappa locus-or-what has been learned from looking closely at one-tenth of a percent of the human genome. *Gene* **135**, 167-73.
16. Hieter, P.A., Hollis, G.F., Korsmeyer, S.J., Waldmann, T.A., Leder, P. (1981) Clustered arrangement of immunoglobulin lambda constant region genes in man. *Nature* **294**, 536-40.
17. Korsmeyer, S.J., Hieter, P.A., Ravetch, J.V., Poplack, D.G., Waldmann, T.A., Leder, P. (1981) Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7096-100.
18. Tang, J.Q., Bene, M.C., Faure, G.C. (1991) Alternative rearrangements of immunoglobulin light chain genes in human leukemia. *Leukemia* **5**, 651-6.
19. Pauza, M.E., Rehmann, J.A., LeBien, T.W. (1993) Unusual patterns of immunoglobulin gene rearrangement and expression during human B cell ontogeny: human B cells can simultaneously express cell surface kappa and lambda light chains. *J Exp Med* **178**, 139-49.

20. Yancopoulos, G.D., Alt, F.W. (1985) Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* **40**, 271-81.
21. Espinoza, C.R., Feeney, A.J. (2005) The extent of histone acetylation correlates with the differential rearrangement frequency of individual VH genes in pro-B cells. *J Immunol* **175**, 6668-75.
22. Xu, C.R., Feeney, A.J. (2009) The epigenetic profile of Ig genes is dynamically regulated during B cell differentiation and is modulated by pre-B cell receptor signaling. *J Immunol* **182**, 1362-9.
23. Johnson, K., Angelin-Duclos, C., Park, S., Calame, K.L. (2003) Changes in histone acetylation are associated with differences in accessibility of V(H) gene segments to V-DJ recombination during B-cell ontogeny and development. *Mol Cell Biol* **23**, 2438-50.
24. Morshead, K.B., Ciccone, D.N., Taverna, S.D., Allis, C.D., Oettinger, M.A. (2003) Antigen receptor loci poised for V(D)J rearrangement are broadly associated with BRG1 and flanked by peaks of histone H3 dimethylated at lysine 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11577-82.
25. Espinoza, C.R., Feeney, A.J. (2007) Chromatin accessibility and epigenetic modifications differ between frequently and infrequently rearranging VH genes. *Mol Immunol* **44**, 2675-85.
26. Matthews, A.G., Kuo, A.J., Ramon-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**, 1106-10.
27. Akamatsu, Y., Tsurushita, N., Nagawa, F., Matsuoka, M., Okazaki, K., Imai, M., Sakano, H. (1994) Essential residues in V(D)J recombination signals. *J Immunol* **153**, 4520-9.
28. Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., Hood, L. (1980) An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* **19**, 981-92.
29. Roth, D.B., Nakajima, P.B., Menetski, J.P., Bosma, M.J., Gellert, M. (1992) V(D)J recombination in mouse thymocytes: double-strand breaks near T cell receptor delta rearrangement signals. *Cell* **69**, 41-53.
30. Schatz, D.G., Oettinger, M.A., Baltimore, D. (1989) The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* **59**, 1035-48.
31. Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., Baltimore, D. (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517-23.
32. Corneo, B., Moshous, D., Gungor, T., Wulffraat, N., Philippet, P., Le Deist, F.L., Fischer, A., de Villartay, J.P. (2001) Identical mutations in RAG1 or RAG2 genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B-severe combined immune deficiency or Omenn syndrome. *Blood* **97**, 2772-6.
33. Blunt, T., Finnie, N.J., Taccioli, G.E., Smith, G.C., Demengeot, J., Gottlieb, T.M., Mizuta, R., Varghese, A.J., Alt, F.W., Jeggo, P.A., et al. (1995) Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* **80**, 813-23.
34. Smider, V., Rathmell, W.K., Lieber, M.R., Chu, G. (1994) Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. *Science* **266**, 288-91.

35. Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P., Jeggo, P.A. (1994) Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* **265**, 1442-5.
36. Taccioli, G.E., Alt, F.W. (1995) Potential targets for autosomal SCID mutations. *Curr Opin Immunol* **7**, 436-40.
37. Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A., de Villartay, J.P. (2001) Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* **105**, 177-86.
38. Grawunder, U., Zimmer, D., Kulesza, P., Lieber, M.R. (1998) Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo. *J Biol Chem* **273**, 24708-14.
39. Li, Z., Otevrel, T., Gao, Y., Cheng, H.L., Seed, B., Stamato, T.D., Taccioli, G.E., Alt, F.W. (1995) The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* **83**, 1079-89.
40. Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., Papaioannou, V.E. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-77.
41. Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., et al. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-67.
42. Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J., Schatz, D.G. (2000) The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* **18**, 495-527.
43. Hefferin, M.L., Tomkinson, A.E. (2005) Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**, 639-48.
44. Weterings, E., Chen, D.J. (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* **18**, 114-24.
45. Jeggo, P.A. (1998) DNA breakage and repair. *Adv Genet* **38**, 185-218.
46. Goodarzi, A.A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R., Harer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., Lees-Miller, S.P. (2006) DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J* **25**, 3880-9.
47. 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**, 781-94.
48. Reynaud, C.A., Frey, S., Aoufouchi, S., Faily, A., Bertocci, B., Dahan, A., Flatter, E., Delbos, F., Storck, S., Zober, C., Weill, J.C. (2001) Transcription, beta-like DNA polymerases and hypermutation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 91-7.
49. Bertocci, B., De Smet, A., Weill, J.C., Reynaud, C.A. (2006) Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo. *Immunity* **25**, 31-41.
50. Komori, T., Okada, A., Stewart, V., Alt, F.W. (1993) Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* **261**, 1171-5.
51. Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., Mathis, D. (1993) Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* **261**, 1175-8.
52. Bertocci, B., De Smet, A., Berek, C., Weill, J.C., Reynaud, C.A. (2003) Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity* **19**, 203-11.

53. Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M.F., Lieber, M.R. (2007) XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO Journal* **26**, 1010-1023.
54. Purugganan, M.M., Shah, S., Kearney, J.F., Roth, D.B. (2001) Ku80 is required for addition of N nucleotides to V(D)J recombination junctions by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res* **29**, 1638-46.
55. Bogue, M.A., Wang, C., Zhu, C., Roth, D.B. (1997) V(D)J recombination in Ku86-deficient mice: distinct effects on coding, signal, and hybrid joint formation. *Immunity* **7**, 37-47.
56. Gu, Y., Seidl, K.J., Rathbun, G.A., Zhu, C., Manis, J.P., van der Stoep, N., Davidson, L., Cheng, H.L., Sekiguchi, J.M., Frank, K., Stanhope-Baker, P., Schlissel, M.S., Roth, D.B., Alt, F.W. (1997) Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* **7**, 653-65.
57. 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**, 13926-31.
58. Mahajan, K.N., Nick McElhinny, S.A., Mitchell, B.S., Ramsden, D.A. (2002) Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **22**, 5194-202.
59. Mickelsen, S., Snyder, C., Trujillo, K., Bogue, M., Roth, D.B., Meek, K. (1999) Modulation of terminal deoxynucleotidyltransferase activity by the DNA-dependent protein kinase. *J Immunol* **163**, 834-43.
60. Carotta, S., Nutt, S.L. (2008) Losing B cell identity. *Bioessays* **30**, 203-7.
61. Zhang, Z., Espinoza, C.R., Yu, Z., Stephan, R., He, T., Williams, G.S., Burrows, P.D., Hagman, J., Feeney, A.J., Cooper, M.D. (2006) Transcription factor Pax5 (BSAP) transactivates the RAG-mediated VH-to-DJH rearrangement of immunoglobulin genes. *Nature Immunology* **7**, 616-624.
62. Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., Busslinger, M. (2004) Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev* **18**, 411-22.
63. Huang, J., Muegge, K. (2001) Control of chromatin accessibility for V(D)J recombination by interleukin-7. *J Leukoc Biol* **69**, 907-11.
64. Park, S.Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H., Hirayama, N., Miyake, K., Nakauchi, H., Shirasawa, T., Saito, T. (1995) Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* **3**, 771-82.
65. DiSanto, J.P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., Rajewsky, K. (1995) Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 377-81.
66. Cao, X., Shores, E.W., Hu-Li, J., Anver, M.R., Kelsall, B.L., Russell, S.M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., Bloom, E.T., et al. (1995) Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* **2**, 223-38.
67. Nosaka, T., van Deursen, J.M., Tripp, R.A., Thierfelder, W.E., Witthuhn, B.A., McMickle, A.P., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., Ihle, J.N. (1995) Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* **270**, 800-2.
68. Thomis, D.C., Gurniak, C.B., Tivol, E., Sharpe, A.H., Berg, L.J. (1995) Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science* **270**, 794-7.

69. Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H.M., Filipovich, A.H., Adelstein, S., Modi, W.S., McBride, O.W., Leonard, W.J. (1993) Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* **73**, 147-57.
70. Puel, A., Leonard, W.J. (2000) Mutations in the gene for the IL-7 receptor result in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency disease. *Curr Opin Immunol* **12**, 468-73.
71. Chothia, C., Lesk, A.M. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* **196**, 901-17.
72. Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davies, D., Tulip, W.R., et al. (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* **342**, 877-83.
73. Tramontano, A., Chothia, C., Lesk, A.M. (1990) Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the VH domains of immunoglobulins. *J Mol Biol* **215**, 175-82.
74. Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., Chothia, C. (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* **273**, 927-48.
75. Morea, V., Tramontano, A., Rustici, M., Chothia, C., Lesk, A.M. (1998) Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins. *J Mol Biol* **275**, 269-94.
76. Barre, S., Greenberg, A.S., Flajnik, M.F., Chothia, C. (1994) Structural conservation of hypervariable regions in immunoglobulins evolution. *Nat Struct Biol* **1**, 915-20.
77. Steele, E.J. (2009) Mechanism of somatic hypermutation: critical analysis of strand biased mutation signatures at A:T and G:C base pairs. *Mol Immunol* **46**, 305-20.
78. Berek, C., Berger, A., Apel, M. (1991) Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* **67**, 1121-9.
79. Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., Brink, R. (2006) Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* **203**, 1081-91.
80. Jacobs, H., Bross, L. (2001) Towards an understanding of somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* **13**, 208-18.
81. Betz, A.G., Milstein, C., Gonzalez-Fernandez, A., Pannell, R., Larson, T., Neuberger, M.S. (1994) Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* **77**, 239-48.
82. Storb, U. (1996) The molecular basis of somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Curr Opin Immunol* **8**, 206-14.
83. Yelamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y.L., Gonzalez Fernandez, A., Pannell, R., Neuberger, M.S., Milstein, C. (1995) Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature* **376**, 225-9.
84. Wagner, S.D., Milstein, C., Neuberger, M.S. (1995) Codon bias targets mutation. *Nature* **376**, 732.
85. Wright, B.E., Schmidt, K.H., Minnick, M.F. (2004) Mechanisms by which transcription can regulate somatic hypermutation. *Genes Immun* **5**, 176-82.
86. Wright, B.E., Schmidt, K.H., Minnick, M.F., Davis, N. (2008) I. VH gene transcription creates stabilized secondary structures for coordinated mutagenesis during somatic hypermutation. *Mol Immunol* **45**, 3589-99.
87. Wright, B.E., Schmidt, K.H., Davis, N., Hunt, A.T., Minnick, M.F. (2008) II. Correlations between secondary structure stability and mutation frequency during somatic hypermutation. *Mol Immunol* **45**, 3600-8.

88. Steele, E.J., Lindley, R.A., Wen, J., Weiller, G.F. (2006) Computational analyses show A-to-G mutations correlate with nascent mRNA hairpins at somatic hypermutation hotspots. *DNA Repair (Amst)* **5**, 1346-63.
89. Reynaud, C.A., Delbos, F., Faili, A., Gueranger, Q., Aoufouchi, S., Weill, J.C. (2009) Competitive repair pathways in immunoglobulin gene hypermutation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 613-9.
90. Shen, H.M., Poirier, M.G., Allen, M.J., North, J., Lal, R., Widom, J., Storb, U. (2009) The activation-induced cytidine deaminase (AID) efficiently targets DNA in nucleosomes but only during transcription. *J Exp Med* **206**, 1057-71.
91. Stavnezer, J., Amemiya, C.T. (2004) Evolution of isotype switching. *Semin Immunol* **16**, 257-75.
92. Selsing, E. (2006) Ig class switching: targeting the recombinational mechanism. *Curr Opin Immunol* **18**, 249-54.
93. Luby, T.M., Schrader, C.E., Stavnezer, J., Selsing, E. (2001) The mu switch region tandem repeats are important, but not required, for antibody class switch recombination. *J Exp Med* **193**, 159-68.
94. Khamlichi, A.A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M., Cogne, M. (2004) Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood* **103**, 3828-36.
95. Zarrin, A.A., Tian, M., Wang, J., Borjeson, T., Alt, F.W. (2005) Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2466-70.
96. Jung, S., Rajewsky, K., Radbruch, A. (1993) Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* **259**, 984-7.
97. Zhang, J., Bottaro, A., Li, S., Stewart, V., Alt, F.W. (1993) A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *EMBO J* **12**, 3529-37.
98. Bottaro, A., Lansford, R., Xu, L., Zhang, J., Rothman, P., Alt, F.W. (1994) S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J* **13**, 665-74.
99. Harriman, G.R., Bradley, A., Das, S., Rogers-Fani, P., Davis, A.C. (1996) IgA class switch in I alpha exon-deficient mice. Role of germline transcription in class switch recombination. *J Clin Invest* **97**, 477-85.
100. Basu, U., Chaudhuri, J., Phan, R.T., Datta, A., Alt, F.W. (2007) Regulation of activation induced deaminase via phosphorylation. *Adv Exp Med Biol* **596**, 129-37.
101. Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., Manis, J., Alt, F.W. (2007) Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol* **94**, 157-214.
102. Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., Rajewsky, K., Alt, F.W. (2007) IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* **449**, 478-82.
103. Manis, J.P., Tian, M., Alt, F.W. (2002) Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* **23**, 31-9.
104. Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., Honjo, T. (1999) Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* **274**, 18470-6.
105. Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeolouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili,

- H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., Durandy, A. (2000) Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* **102**, 565-75.
106. Larijani, M., Martin, A. (2007) Single-stranded DNA structure and positional context of the target cytidine determine the enzymatic efficiency of AID. *Mol Cell Biol* **27**, 8038-48.
 107. Larijani, M., Petrov, A.P., Kolenchenko, O., Berru, M., Krylov, S.N., Martin, A. (2007) AID associates with single-stranded DNA with high affinity and a long complex half-life in a sequence-independent manner. *Mol Cell Biol* **27**, 20-30.
 108. MacCarthy, T., Kalis, S.L., Roa, S., Pham, P., Goodman, M.F., Scharff, M.D., Bergman, A. (2009) V-region mutation in vitro, in vivo, and in silico reveal the importance of the enzymatic properties of AID and the sequence environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8629-34.
 109. Zhao, Y., Pan-Hammarstrom, Q., Zhao, Z., Hammarstrom, L. (2005) Identification of the activation-induced cytidine deaminase gene from zebrafish: an evolutionary analysis. *Dev Comp Immunol* **29**, 61-71.
 110. Chaudhuri, J., Khuong, C., Alt, F.W. (2004) Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* **430**, 992-8.
 111. Shen, H.M., Storb, U. (2004) Activation-induced cytidine deaminase (AID) can target both DNA strands when the DNA is supercoiled. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12997-3002.
 112. Martin, A., Bardwell, P.D., Woo, C.J., Fan, M., Shulman, M.J., Scharff, M.D. (2002) Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature* **415**, 802-6.
 113. Yoshikawa, K., Okazaki, I.M., Eto, T., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H., Honjo, T. (2002) AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science* **296**, 2033-6.
 114. Okazaki, I.M., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Yoshikawa, K., Honjo, T. (2002) The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature* **416**, 340-5.
 115. Shen, H.M., Bozek, G., Pinkert, C.A., McBride, K., Wang, L., Kenter, A., Storb, U. (2008) Expression of AID transgene is regulated in activated B cells but not in resting B cells and kidney. *Mol Immunol* **45**, 1883-92.
 116. Dorsett, Y., McBride, K.M., Jankovic, M., Gazumyan, A., Thai, T.H., Robbiani, D.F., Di Virgilio, M., San-Martin, B.R., Heidkamp, G., Schwickert, T.A., Eisenreich, T., Rajewsky, K., Nussenzweig, M.C. (2008) MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* **28**, 630-8.
 117. Muto, T., Okazaki, I.M., Yamada, S., Tanaka, Y., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H., Honjo, T. (2006) Negative regulation of activation-induced cytidine deaminase in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2752-7.
 118. Okazaki, I.M., Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Honjo, T. (2003) Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med* **197**, 1173-81.
 119. Endo, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Morisawa, T., Sakurai, T., Okazaki, I.M., Watashi, K., Shimotohno, K., Honjo, T., Chiba, T. (2007) Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kappaB signaling. *Oncogene* **26**, 5587-95.
 120. Hauser, J., Sveshnikova, N., Wallenius, A., Baradaran, S., Saarikettu, J., Grundstrom, T. (2008) B-cell receptor activation inhibits AID expression through calmodulin inhibition of E-proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1267-72.

121. Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K.J., Yokota, Y., Shimizu, A. (2003) The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J Exp Med* **198**, 1427-37.
122. Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F.W., Geha, R.S. (2004) Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol* **16**, 395-404.
123. Park, S.R., Zan, H., Pal, Z., Zhang, J., Al-Qahtani, A., Pone, E.J., Xu, Z., Mai, T., Casali, P. (2009) HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat Immunol* **10**, 540-50.
124. Schmidlin, H., Diehl, S.A., Blom, B. (2009) New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trends Immunol* **30**, 277-85.
125. Aydar, Y., Sukumar, S., Szakal, A.K., Tew, J.G. (2005) The influence of immune complex-bearing follicular dendritic cells on the IgM response, Ig class switching, and production of high affinity IgG. *J Immunol* **174**, 5358-66.
126. Fujimura, S., Matsui, T., Kuwahara, K., Maeda, K., Sakaguchi, N. (2008) Germinal center B-cell-associated DNA hypomethylation at transcriptional regions of the AID gene. *Mol Immunol* **45**, 1712-9.
127. Marr, S., Morales, H., Bottaro, A., Cooper, M., Flajnik, M., Robert, J. (2007) Localization and differential expression of activation-induced cytidine deaminase in the amphibian *Xenopus* upon antigen stimulation and during early development. *J Immunol* **179**, 6783-9.
128. Muto, T., Muramatsu, M., Taniwaki, M., Kinoshita, K., Honjo, T. (2000) Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics* **68**, 85-8.
129. Wu, X., Darce, J.R., Chang, S.K., Nowakowski, G.S., Jelinek, D.F. (2008) Alternative splicing regulates activation-induced cytidine deaminase (AID): implications for suppression of AID mutagenic activity in normal and malignant B cells. *Blood* **112**, 4675-82.
130. de Yebenes, V.G., Belver, L., Pisano, D.G., Gonzalez, S., Villasante, A., Croce, C., He, L., Ramiro, A.R. (2008) miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *J Exp Med* **205**, 2199-206.
131. Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R., Papavasiliou, F.N. (2008) MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* **28**, 621-9.
132. McBride, K.M., Barreto, V., Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Nussenzweig, M.C. (2004) Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J Exp Med* **199**, 1235-44.
133. Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.C., Reynaud, C.A. (2008) Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J Exp Med* **205**, 1357-68.
134. Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M., Honjo, T. (2004) Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1975-80.
135. Geisberger, R., Rada, C., Neuberger, M.S. (2009) The stability of AID and its function in class-switching are critically sensitive to the identity of its nuclear-export sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6736-41.
136. Doi, T., Kato, L., Ito, S., Shinkura, R., Wei, M., Nagaoka, H., Wang, J., Honjo, T. (2009) The C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase is responsible

- for a recombination function other than DNA cleavage in class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2758-63.
137. Pasqualucci, L., Kitaura, Y., Gu, H., Dalla-Favera, R. (2006) PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 395-400.
 138. Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., Alt, F.W. (2005) The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* **438**, 508-11.
 139. Cheng, H.L., Vuong, B.Q., Basu, U., Franklin, A., Schwer, B., Astarita, J., Phan, R.T., Datta, A., Manis, J., Alt, F.W., Chaudhuri, J. (2009) Integrity of the AID serine-38 phosphorylation site is critical for class switch recombination and somatic hypermutation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2717-22.
 140. Vuong, B.Q., Lee, M., Kabir, S., Irimia, C., Macchiarulo, S., McKnight, G.S., Chaudhuri, J. (2009) Specific recruitment of protein kinase A to the immunoglobulin locus regulates class-switch recombination. *Nat Immunol* **10**, 420-6.
 141. McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Barreto, V.M., Robbiani, D.F., Chait, B.T., Nussenzweig, M.C. (2006) Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8798-803.
 142. Rada, C. (2009) AID and RPA: PKA makes the connection local. *Nat Immunol* **10**, 367-9.
 143. Brar, S.S., Sacho, E.J., Tessmer, I., Croteau, D.L., Erie, D.A., Diaz, M. (2008) Activation-induced deaminase, AID, is catalytically active as a monomer on single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst)* **7**, 77-87.
 144. Bhagwat, A.S., Carpenter, M.A., Bujnicki, J.M. (2008) Is AID a monomer in solution? *DNA Repair (Amst)* **7**, 349-50; author reply 351-2.
 145. Prochnow, C., Bransteitter, R., Klein, M.G., Goodman, M.F., Chen, X.S. (2007) The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID. *Nature* **445**, 447-51.
 146. Shivarov, V., Shinkura, R., Honjo, T. (2008) Dissociation of in vitro DNA deamination activity and physiological functions of AID mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15866-71.
 147. Rada, C., Di Noia, J.M., Neuberger, M.S. (2004) Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell* **16**, 163-71.
 148. Begum, N.A., Stanlie, A., Doi, T., Sasaki, Y., Jin, H.W., Kim, Y.S., Nagaoka, H., Honjo, T. (2009) Further evidence for involvement of a noncanonical function of uracil DNA glycosylase in class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2752-7.
 149. Bardwell, P.D., Woo, C.J., Wei, K., Li, Z., Martin, A., Sack, S.Z., Parris, T., Edelmann, W., Scharff, M.D. (2004) Altered somatic hypermutation and reduced class-switch recombination in exonuclease 1-mutant mice. *Nat Immunol* **5**, 224-9.
 150. Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.C., Reynaud, C.A. (2007) DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J Exp Med* **204**, 17-23.
 151. Jansen, J.G., Langerak, P., Tsaalbi-Shtylik, A., van den Berk, P., Jacobs, H., de Wind, N. (2006) Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J Exp Med* **203**, 319-23.
 152. Arakawa, H., Moldovan, G.L., Saribasak, H., Saribasak, N.N., Jentsch, S., Buerstedde, J.M. (2006) A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol* **4**, e366.

153. Schanz, S., Castor, D., Fischer, F., Jiricny, J. (2009) Interference of mismatch and base excision repair during the processing of adjacent U/G mispairs may play a key role in somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5593-8.
154. Kuraoka, I., Endou, M., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H., Tanaka, K. (2003) Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. *J Biol Chem* **278**, 7294-9.
155. Flajnik, M.F. (2002) Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat Rev Immunol* **2**, 688-98.
156. Litman, G.W., Cannon, J.P. (2009) Immunology: Immunity's ancient arms. *Nature* **459**, 784-6.
157. Guo, P., Hirano, M., Herrin, B.R., Li, J., Yu, C., Sadlonova, A., Cooper, M.D. (2009) Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. *Nature* **459**, 796-801.
158. Pancer, Z., Amemiya, C.T., Ehrhardt, G.R., Ceitlin, J., Gartland, G.L., Cooper, M.D. (2004) Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* **430**, 174-80.
159. Zhao, Y., Pan-Hammarstrom, Q., Yu, S., Wertz, N., Zhang, X., Li, N., Butler, J.E., Hammarstrom, L. (2006) Identification of IgF, a hinge-region-containing Ig class, and IgD in *Xenopus tropicalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12087-92.
160. Fellah, J.S., Charlemagne, J. (1988) Characterization of an IgY-like low molecular weight immunoglobulin class in the Mexican axolotl. *Mol Immunol* **25**, 1377-86.
161. Fellah, J.S., Ischaki, S., Vaerman, J.P., Charlemagne, J. (1992) Transient developmental expression of IgY and secretory component like protein in the gut of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev Immunol* **2**, 181-90.
162. Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., Steiner, L.A. (2005) The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol* **6**, 295-302.
163. Hansen, J.D., Landis, E.D., Phillips, R.B. (2005) Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6919-24.
164. Savan, R., Aman, A., Sato, K., Yamaguchi, R., Sakai, M. (2005) Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur J Immunol* **35**, 3320-31.
165. Hordvik, I., Thevarajan, J., Samdal, I., Bastani, N., Krossoy, B. (1999) Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand J Immunol* **50**, 202-10.
166. Saha, N.R., Suetake, H., Kikuchi, K., Suzuki, Y. (2004) Fugu immunoglobulin D: a highly unusual gene with unprecedented duplications in its constant region. *Immunogenetics* **56**, 438-47.
167. Srisapoome, P., Ohira, T., Hirano, I., Aoki, T. (2004) Genes of the constant regions of functional immunoglobulin heavy chain of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics* **56**, 292-300.
168. Stenvik, J., Jorgensen, T.O. (2000) Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. *Immunogenetics* **51**, 452-61.
169. Wilson, M., Bengten, E., Miller, N.W., Clem, L.W., Du Pasquier, L., Warr, G.W. (1997) A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4593-7.
170. Hirano, I., Nam, B.H., Enomoto, J., Uchino, K., Aoki, T. (2003) Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. *Fish Shellfish Immunol* **15**, 63-70.

171. Ohta, Y., Flajnik, M. (2006) IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10723-8.
172. Roux, K.H., Greenberg, A.S., Greene, L., Strelets, L., Avila, D., McKinney, E.C., Flajnik, M.F. (1998) Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11804-9.
173. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-8.
174. Kofler, R., Geley, S., Kofler, H., Helmberg, A. (1992) Mouse variable-region gene families: complexity, polymorphism and use in non-autoimmune responses. *Immunol Rev* **128**, 5-21.
175. Dufour, V., Malinge, S., Nau, F. (1996) The sheep Ig variable region repertoire consists of a single VH family. *J Immunol* **156**, 2163-70.
176. Becker, R.S., Knight, K.L. (1990) Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell* **63**, 987-97.
177. Reynaud, C.A., Anquez, V., Grimal, H., Weill, J.C. (1987) A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* **48**, 379-88.
178. Reynaud, C.A., Dahan, A., Anquez, V., Weill, J.C. (1989) Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* **59**, 171-83.
179. Haire, R.N., Amemiya, C.T., Suzuki, D., Litman, G.W. (1990) Eleven distinct VH gene families and additional patterns of sequence variation suggest a high degree of immunoglobulin gene complexity in a lower vertebrate, *Xenopus laevis*. *J Exp Med* **171**, 1721-37.
180. Golub, R., Charlemagne, J. (1998) Structure, diversity, and repertoire of VH families in the Mexican axolotl. *J Immunol* **160**, 1233-9.
181. Roman, T., Andersson, E., Bengten, E., Hansen, J., Kaattari, S., Pilstrom, L., Charlemagne, J., Matsunaga, T. (1996) Unified nomenclature of Ig VH genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): definition of eleven VH families. *Immunogenetics* **43**, 325-6.
182. Ventura-Holman, T., Ghafari, S.H., Lobb, C.J. (1996) Characterization of a seventh family of immunoglobulin heavy chain VH gene segments in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Eur J Immunogenet* **23**, 7-14.
183. Danilova, N., Hohman, V.S., Kim, E.H., Steiner, L.A. (2000) Immunoglobulin variable-region diversity in the zebrafish. *Immunogenetics* **52**, 81-91.
184. Fripiat, C., Kremarik, P., Ropars, A., Dournon, C., Fripiat, J.P. (2001) The recombination-activating gene 1 of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) is transcribed in lymphoid tissues and in the central nervous system. *Immunogenetics* **52**, 264-75.
185. Lee, A., Hsu, E. (1994) Isolation and characterization of the *Xenopus* terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Immunol* **152**, 4500-7.
186. Beetz, S., Diekhoff, D., Steiner, L.A. (2007) Characterization of terminal deoxynucleotidyl transferase and polymerase mu in zebrafish. *Immunogenetics* **59**, 735-44.
187. Golub, R., Andre, S., Hassanin, A., Affaticati, P., Larijani, M., Fellah, J.S. (2004) Early expression of two TdT isoforms in the hematopoietic system of the Mexican axolotl. Implications for the evolutionary origin of the N-nucleotide addition. *Immunogenetics* **56**, 204-13.

188. Mage, R.G., Lanning, D., Knight, K.L. (2006) B cell and antibody repertoire development in rabbits: the requirement of gut-associated lymphoid tissues. *Dev Comp Immunol* **30**, 137-53.
189. Du Pasquier, L., Robert, J., Courtet, M., Mussmann, R. (2000) B-cell development in the amphibian *Xenopus*. *Immunol Rev* **175**, 201-13.
190. Wilson, M., Hsu, E., Marcuz, A., Courtet, M., Du Pasquier, L., Steinberg, C. (1992) What limits affinity maturation of antibodies in *Xenopus*--the rate of somatic mutation or the ability to select mutants? *EMBO J* **11**, 4337-47.
191. Patel, H.M., Hsu, E. (1997) Abbreviated junctional sequences impoverish antibody diversity in urodele amphibians. *J Immunol* **159**, 3391-9.
192. Miracle, A.L., Anderson, M.K., Litman, R.T., Walsh, C.J., Luer, C.A., Rothenberg, E.V., Litman, G.W. (2001) Complex expression patterns of lymphocyte-specific genes during the development of cartilaginous fish implicate unique lymphoid tissues in generating an immune repertoire. *Int Immunol* **13**, 567-80.
193. Makela, O., Litman, G.W. (1980) Lack of heterogeneity in antihapten antibodies of a phylogenetically primitive shark. *Nature* **287**, 639-40.
194. Harding, F.A., Cohen, N., Litman, G.W. (1990) Immunoglobulin heavy chain gene organization and complexity in the skate, *Raja erinacea*. *Nucleic Acids Res* **18**, 1015-20.
195. Rumfelt, L.L., Lohr, R.L., Dooley, H., Flajnik, M.F. (2004) Diversity and repertoire of IgW and IgM VH families in the newborn nurse shark. *BMC Immunol* **5**, 8.
196. Cannon, J.P., Haire, R.N., Rast, J.P., Litman, G.W. (2004) The phylogenetic origins of the antigen-binding receptors and somatic diversification mechanisms. *Immunol Rev* **200**, 12-22.
197. Charlemagne, J., Tournefier (1977) Humoral response to *Salmonella typhimurium* antigens in normal and thymectomized urodele amphibian *Pleurodeles waltlii* Michah. *Eur J Immunol* **7**, 500-2.
198. Casellas, R., Yamane, A., Kovalchuk, A.L., Potter, M. (2009) Restricting activation-induced cytidine deaminase tumorigenic activity in B lymphocytes. *Immunology* **126**, 316-328.
199. Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C. (2008) AID Is Required for the Chromosomal Breaks in c-myc that Lead to c-myc/IgH Translocations. *Cell* **135**, 1028-1038.
200. Sernandez, I.V., de Yébenes, V.G., Dorsett, Y., Ramiro, A.R. (2008) Haploinsufficiency of activation-induced deaminase for antibody diversification and chromosome translocations both in vitro and in vivo. *PLoS ONE* **3**.
201. Saunders, H.L., Magor, B.G. (2004) Cloning and expression of the AID gene in the channel catfish. *Dev Comp Immunol* **28**, 657-63.
202. Barreto, V.M., Pan-Hammarstrom, Q., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Misulovin, Z., Nussenzweig, M.C. (2005) AID from bony fish catalyzes class switch recombination. *J Exp Med* **202**, 733-8.
203. Wakae, K., Magor, B.G., Saunders, H., Nagaoka, H., Kawamura, A., Kinoshita, K., Honjo, T., Muramatsu, M. (2006) Evolution of class switch recombination function in fish activation-induced cytidine deaminase, AID. *Int Immunol* **18**, 41-7.
204. Ichikawa, H.T., Sowden, M.P., Torelli, A.T., Bachl, J., Huang, P., Dance, G.S., Marr, S.H., Robert, J., Wedekind, J.E., Smith, H.C., Bottaro, A. (2006) Structural phylogenetic analysis of activation-induced deaminase function. *J Immunol* **177**, 355-61.

205. Basu, U., Wang, Y., Alt, F.W. (2008) Evolution of phosphorylation-dependent regulation of activation-induced cytidine deaminase. *Mol Cell* **32**, 285-91.
206. Mussmann, R., Courtet, M., Schwager, J., Du Pasquier, L. (1997) Microsites for immunoglobulin switch recombination breakpoints from *Xenopus* to mammals. *Eur J Immunol* **27**, 2610-9.
207. Zarrin, A.A., Alt, F.W., Chaudhuri, J., Stokes, N., Kaushal, D., Du Pasquier, L., Tian, M. (2004) An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* **5**, 1275-81.
208. Nieto, A., Gaya, A., Jansa, M., Moreno, C., Vives, J. (1984) Direct measurement of antibody affinity distribution by hapten-inhibition enzyme immunoassay. *Mol Immunol* **21**, 537-43.
209. Cain, K.D., Jones, D.R., Raison, R.L. (2002) Antibody-antigen kinetics following immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a T-cell dependent antigen. *Dev Comp Immunol* **26**, 181-90.
210. Diaz, M., Velez, J., Singh, M., Cerny, J., Flajnik, M.F. (1999) Mutational pattern of the nurse shark antigen receptor gene (NAR) is similar to that of mammalian Ig genes and to spontaneous mutations in evolution: the translesion synthesis model of somatic hypermutation. *Int Immunol* **11**, 825-33.
211. Diaz, M., Greenberg, A.S., Flajnik, M.F. (1998) Somatic hypermutation of the new antigen receptor gene (NAR) in the nurse shark does not generate the repertoire: possible role in antigen-driven reactions in the absence of germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14343-8.
212. Stanfield, R.L., Dooley, H., Verdino, P., Flajnik, M.F., Wilson, I.A. (2007) Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding. *J Mol Biol* **367**, 358-72.
213. Dooley, H., Stanfield, R.L., Brady, R.A., Flajnik, M.F. (2006) First molecular and biochemical analysis of in vivo affinity maturation in an ectothermic vertebrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1846-51.
214. Kimzey, S.L. (1977) Hematology and immunology studies. In *Biomedical Results from Skylab* (R. S. Johnson and L. F. Dietlein, eds), NASA, Washington, DC 248-282.
215. Brumfiel, G. (2007) Space exploration: where 24 men have gone before. *Nature* **445**, 474-8.
216. Taylor, G.R. (1974) Space microbiology. *Annu Rev Microbiol* **28**, 121-37.
217. Leys, N., Baatout, S., Rosier, C., Dams, A., s'Heeren, C., Wattiez, R., Mergeay, M. (2009) The response of *Cupriavidus metallidurans* CH34 to spaceflight in the international space station. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**, 227-45.
218. Hammond, T.G., Benes, E., O'Reilly, K.C., Wolf, D.A., Linnehan, R.M., Taher, A., Kaysen, J.H., Allen, P.L., Goodwin, T.J. (2000) Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle. *Physiol Genomics* **3**, 163-73.
219. 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**, 41-7.
220. Tixador, R., Gasset, G., Eche, B., Moatti, N., Lapchine, L., Woldringh, C., Toorop, P., Moatti, J.P., Delmotte, F., Tap, G. (1994) Behavior of bacteria and antibiotics under space conditions. *Aviat Space Environ Med* **65**, 551-6.
221. Durnova, G.N., Kaplansky, A.S., Portugalov, V.V. (1976) Effect of a 22-day space flight on the lymphoid organs of rats. *Aviat Space Environ Med* **47**, 588-91.
222. Gridley, D.S., Nelson, G.A., Peters, L.L., Kostenuik, P.J., Bateman, T.A., Morony, S., Stodieck, L.S., Lacey, D.L., Simske, S.J., Pecaut, M.J. (2003) Genetic models in

- applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. II. Activation, cytokines, erythrocytes, and platelets. *J Appl Physiol* **94**, 2095-103.
223. Baqai, F.P., Gridley, D.S., Slater, J.M., Luo-Owen, X., Stodieck, L.S., Ferguson, V.L., Chapes, S.K., Pecaut, M.J. (2009) Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. *J Appl Physiol*.
 224. Steffen, J.M., Musacchia, X.J. (1986) Thymic involution in the suspended rat: adrenal hypertrophy and glucocorticoid receptor content. *Aviat Space Environ Med* **57**, 162-7.
 225. Pecaut, M.J., Simske, S.J., Fleshner, M. (2000) Spaceflight induces changes in splenocyte subpopulations: effectiveness of ground-based models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R2072-8.
 226. Chapes, S.K., Simske, S.J., Forsman, A.D., Bateman, T.A., Zimmerman, R.J. (1999) Effects of space flight and IGF-1 on immune function. *Adv Space Res* **23**, 1955-64.
 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. *J Appl Physiol* **86**, 2065-76.
 228. Congdon, C.C., Allebban, Z., Gibson, L.A., Kaplansky, A., Strickland, K.M., Jago, T.L., Johnson, D.L., Lange, R.D., Ichiki, A.T. (1996) Lymphatic tissue changes in rats flown on Spacelab Life Sciences-2. *J Appl Physiol* **81**, 172-7.
 229. Gould, C.L., Lyte, M., Williams, J., Mandel, A.D., Sonnenfeld, G. (1987) Inhibited interferon-gamma but normal interleukin-3 production from rats flown on the space shuttle. *Aviat Space Environ Med* **58**, 983-6.
 230. Grove, D.S., Pishak, S.A., Mastro, A.M. (1995) The effect of a 10-day space flight on the function, phenotype, and adhesion molecule expression of splenocytes and lymph node lymphocytes. *Exp Cell Res* **219**, 102-9.
 231. Stowe, R.P., Sams, C.F., Mehta, S.K., Kaur, I., Jones, M.L., Feeback, D.L., Pierson, D.L. (1999) Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J Leukoc Biol* **65**, 179-86.
 232. Vernikos, J. (1996) Human physiology in space. *Bioessays* **18**, 1029-37.
 233. Kaur, I., Simons, E.R., Castro, V.A., Ott, C.M., Pierson, D.L. (2005) Changes in monocyte functions of astronauts. *Brain Behav Immun* **19**, 547-54.
 234. Rykova, M.P., Antropova, E.N., Larina, I.M., Morukov, B.V. (2008) Humoral and cellular immunity in cosmonauts after the ISS missions. *Acta Astronautica* **63**, 697-705.
 235. Kaur, I., Simons, E.R., Kapadia, A.S., Ott, C.M., Pierson, D.L. (2008) Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 1523-8.
 236. Crucian, B.E., Cubbage, M.L., Sams, C.F. (2000) Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. *J Interferon Cytokine Res* **20**, 547-56.
 237. Sonnenfeld, G. (1994) Effect of space flight on cytokine production. *Acta Astronaut* **33**, 143-7.
 238. Lesnyak, A.T., Sonnenfeld, G., Rykova, M.P., Meshkov, D.O., Mastro, A., Konstantinova, I. (1993) Immune changes in test animals during spaceflight. *J Leukoc Biol* **54**, 214-26.
 239. Rykova, M.P., Sonnenfeld, G., Lesnyak, A.T., Taylor, G.R., Meshkov, D.O., Mandel, A.D., Medvedev, A.E., Berry, W.D., Fuchs, B.B., Konstantinova, I.V. (1992) Effect of spaceflight on natural killer cell activity. *J Appl Physiol* **73**, 196S-200S.
 240. Taylor, G.R., Janney, R.P. (1992) In vivo testing confirms a blunting of the human cell-mediated immune mechanism during space flight. *J Leukoc Biol* **51**, 129-32.

241. Lesnyak, A., Sonnenfeld, G., Avery, L., Konstantinova, I., Rykova, M., Meshkov, D., Orlova, T. (1996) Effect of SLS-2 spaceflight on immunologic parameters of rats. *J Appl Physiol* **81**, 178-82.
242. Konstantinova, I.V., Rykova, M., Meshkov, D., Peres, C., Husson, D., Schmitt, D.A. (1995) Natural killer cells after ALTAIR mission. *Acta Astronaut* **36**, 713-8.
243. Meshkov, D., Rykova, M. (1995) The natural cytotoxicity in cosmonauts on board space stations. *Acta Astronaut* **36**, 719-26.
244. Mehta, S.K., Kaur, I., Grimm, E.A., Smid, C., Feedback, D.L., Pierson, D.L. (2001) Decreased non-MHC-restricted (CD56+) killer cell cytotoxicity after spaceflight. *J Appl Physiol* **91**, 1814-8.
245. Mehta, S.K., Stowe, R.P., Feiveson, A.H., Tying, S.K., Pierson, D.L. (2000) Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. *J Infect Dis* **182**, 1761-4.
246. Stowe, R.P., Mehta, S.K., Ferrando, A.A., Feedback, D.L., Pierson, D.L. (2001) Immune responses and latent herpesvirus reactivation in spaceflight. *Aviat Space Environ Med* **72**, 884-91.
247. Stowe, R.P., Pierson, D.L., Barrett, A.D. (2001) Elevated stress hormone levels relate to Epstein-Barr virus reactivation in astronauts. *Psychosom Med* **63**, 891-5.
248. 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**, 235-42.
249. Cohrs, R.J., Mehta, S.K., Schmid, D.S., Gilden, D.H., Pierson, D.L. (2008) Asymptomatic reactivation and shed of infectious varicella zoster virus in astronauts. *J Med Virol* **80**, 1116-22.
250. Aviles, H., Belay, T., Fountain, K., Vance, M., Sonnenfeld, G. (2003) Increased susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infection under hindlimb-unloading conditions. *J Appl Physiol* **95**, 73-80.
251. Aviles, H., Belay, T., Vance, M., Sonnenfeld, G. (2005) Effects of space flight conditions on the function of the immune system and catecholamine production simulated in a rodent model of hindlimb unloading. *Neuroimmunomodulation* **12**, 173-81.
252. O'Donnell, P.M., Orshal, J.M., Sen, D., Sonnenfeld, G., Aviles, H.O. (2009) Effects of exposure of mice to hindlimb unloading on leukocyte subsets and sympathetic nervous system activity. *Stress* **12**, 82-8.
253. Tipton, C.M., Greenleaf, J.E., Jackson, C.G. (1996) Neuroendocrine and immune system responses with spaceflights. *Med Sci Sports Exerc* **28**, 988-98.
254. Meehan, R., Whitson, P., Sams, C. (1993) The role of psychoneuroendocrine factors on spaceflight-induced immunological alterations. *J Leukoc Biol* **54**, 236-44.
255. 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.
256. Sonnenfeld, G., Mandel, A.D., Konstantinova, I.V., Berry, W.D., Taylor, G.R., Lesnyak, A.T., Fuchs, B.B., Rakhmilevich, A.L. (1992) Spaceflight alters immune cell function and distribution. *J Appl Physiol* **73**, 191S-195S.
257. Armstrong, J.W., Kirby-Dobbels, K., Chapes, S.K. (1995) The effects of rM-CSF and rIL-6 therapy on immunosuppressed antiorthostatically suspended mice. *J Appl Physiol* **78**, 968-75.
258. 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**, 419-26.

259. Ortega, M.T., Pecaut, M.J., Gridley, D.S., Stodieck, L.S., Ferguson, V., Chapes, S.K. (2009) Shifts in bone marrow cell phenotypes caused by spaceflight. *J Appl Physiol* **106**, 548-55.
260. Konstantinova, I.V., Antropova, Y.N., Legenkov, V.I., Zazhirey, V.D. (1973) Study of the reactivity of blood lymphoid cells in crew members of the Soyuz-6,7 and 8 spaceships before and after flight. *Space Biol Aerosp Med* **7**, 48-55.
261. Gridley, D.S., Slater, J.M., Luo-Owen, X., Rizvi, A., Chapes, S.K., Stodieck, L.S., Ferguson, V.L., Pecaut, M.J. (2009) Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J Appl Physiol* **106**, 194-202.
262. Nash, P.V., Mastro, A.M. (1992) Variable lymphocyte responses in rats after space flight. *Exp Cell Res* **202**, 125-31.
263. Chapes, S.K. (2004) Lessons from Immune 1-3: what did we learn and what do we need to do in the future? *J Gravit Physiol* **11**, P45-8.
264. Sonnenfeld, G., Foster, M., Morton, D., Bailliard, F., Fowler, N.A., Hakenewerth, A.M., Bates, R., Miller, E.S., Jr. (1998) Spaceflight and development of immune responses. *J Appl Physiol* **85**, 1429-33.
265. Cogoli, A., Bechler, B., Cogoli-Greuter, M., Criswell, S.B., Joller, H., Joller, P., Hunzinger, E., Muller, O. (1993) Mitogenic signal transduction in T lymphocytes in microgravity. *J Leukoc Biol* **53**, 569-75.
266. Pippia, P., Sciola, L., Cogoli-Greuter, M., Meloni, M.A., Spano, A., Cogoli, A. (1996) Activation signals of T lymphocytes in microgravity. *J Biotechnol* **47**, 215-22.
267. 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**, 2020-2.
268. Crucian, B.E., Stowe, R.P., Pierson, D.L., Sams, C.F. (2008) Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med* **79**, 835-43.
269. Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-93.
270. Voss, E.W., Jr. (1984) Prolonged weightlessness and humoral immunity. *Science* **225**, 214-5.
271. Konstantinova, I.V., Rykova, M.P., Lesnyak, A.T., Antropova, E.A. (1993) Immune changes during long-duration missions. *J Leukoc Biol* **54**, 189-201.
272. Boxio, R., Dournon, C., Fripiat, J.P. (2005) Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J Appl Physiol* **98**, 905-10.
273. Bascove, M., Huin-Schohn, C., Gueguinou, N., Tschirhart, E., Fripiat, J.P. (2009) Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J* **23**, 1607-15.
274. Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M., Hood, L., Wall, R. (1980) Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell* **20**, 303-12.
275. Wiersma, E.J., Chen, F., Bazin, R., Collins, C., Painter, R.H., Lemieux, R., Shulman, M.J. (1997) Analysis of IgM structures involved in J chain incorporation. *J Immunol* **158**, 1719-26.
276. Yoo, E.M., Coloma, M.J., Trinh, K.R., Nguyen, T.Q., Vuong, L.U., Morrison, S.L., Chintalacheruvu, K.R. (1999) Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain. *J Biol Chem* **274**, 33771-7.
277. Deza, F.G., Espinel, C.S., Beneitez, J.V. (2007) A novel IgA-like immunoglobulin in the reptile *Eublepharis macularius*. *Dev Comp Immunol* **31**, 596-605.

278. Hsu, E., Du Pasquier, L. (1992) Changes in the amphibian antibody repertoire are correlated with metamorphosis and not with age or size. *Dev Immunol* **2**, 1-6.
279. Chen, Z.J., Wheeler, C.J., Shi, W., Wu, A.J., Yarboro, C.H., Gallagher, M., Notkins, A.L. (1998) Polyreactive antigen-binding B cells are the predominant cell type in the newborn B cell repertoire. *Eur J Immunol* **28**, 989-94.
280. Sanz, I., Casali, P., Thomas, J.W., Notkins, A.L., Capra, J.D. (1989) Nucleotide sequences of eight human natural autoantibody VH regions reveals apparent restricted use of VH families. *J Immunol* **142**, 4054-61.
281. Pecaut, M.J., Nelson, G.A., Peters, L.L., Kostenuik, P.J., Bateman, T.A., Morony, S., Stodieck, L.S., Lacey, D.L., Simske, S.J., Gridley, D.S. (2003) Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. I. Immune population distributions. *J Appl Physiol* **94**, 2085-94.
282. Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J.K. (2005) Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* **5**, 243-51.
283. Pecaut, M.J., Nelson, G.A., Gridley, D.S. (2001) Dose and dose rate effects of whole-body gamma-irradiation: I. Lymphocytes and lymphoid organs. *In Vivo* **15**, 195-208.
284. Bouic, P.J., Clark, A., Lamprecht, J., Freestone, M., Pool, E.J., Liebenberg, R.W., Kotze, D., van Jaarsveld, P.P. (1999) The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *Int J Sports Med* **20**, 258-62.
285. Gridley, D.S., Pecaut, M.J., Dutta-Roy, R., Nelson, G.A. (2002) Dose and dose rate effects of whole-body proton irradiation on leukocyte populations and lymphoid organs: part I. *Immunol Lett* **80**, 55-66.
286. Gridley, D.S., Rizvi, A., Luo-Owen, X., Makinde, A.Y., Coutrakon, G.B., Koss, P., Slater, J.M., Pecaut, M.J. (2008) Variable hematopoietic responses to acute photons, protons and simulated solar particle event protons. *In Vivo* **22**, 159-69.
287. Qiao, J., Holian, O., Lee, B.S., Huang, F., Zhang, J., Lum, H. (2008) Phosphorylation of GTP dissociation inhibitor by PKA negatively regulates RhoA. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C1161-8.
288. Ramadan, O., Qu, Y., Wadgaonkar, R., Baroudi, G., Karnabi, E., Chahine, M., Boutjdir, M. (2009) Phosphorylation of the consensus sites of protein kinase A on alpha1D L-type calcium channel. *J Biol Chem* **284**, 5042-9.
289. Ta, V.T., Nagaoka, H., Catalan, N., Durandy, A., Fischer, A., Imai, K., Nonoyama, S., Tashiro, J., Ikegawa, M., Ito, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Honjo, T. (2003) AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol* **4**, 843-8.
290. Kasahara, Y., Kaneko, H., Fukao, T., Terada, T., Asano, T., Kasahara, K., Kondo, N. (2003) Hyper-IgM syndrome with putative dominant negative mutation in activation-induced cytidine deaminase. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 755-60.
291. Zhu, Y., Nonoyama, S., Morio, T., Muramatsu, M., Honjo, T., Mizutani, S. (2003) Type two hyper-IgM syndrome caused by mutation in activation-induced cytidine deaminase. *J Med Dent Sci* **50**, 41-6.
292. Wu, X., Gerald, P., Platt, J.L., Cascalho, M. (2005) The double-edged sword of activation-induced cytidine deaminase. *J Immunol* **174**, 934-41.
293. Morgan, H.D., Dean, W., Coker, H.A., Reik, W., Petersen-Mahrt, S.K. (2004) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* **279**, 52353-60.

294. Boudarra, N., Fripiat, C., Dournon, C., Fripiat, J.P. (2002) An alternative internal splicing site defines new Ikaros isoforms in *Pleurodeles waltl*. *Dev Comp Immunol* **26**, 659-73.
295. Manning, M.J. (1979) Evolution of the vertebrate immune system. *J R Soc Med* **72**, 683-8.
296. Charlemagne, J. (1990) Immunologie des Poïkilothermes. In : Pastoret P-P, Govaerts A., Bazin H (eds) *Immunologie animale. Médecine-Sciences Flammarion*, Paris 447-457.
297. Cooper, E.-L. (1990) Phylogénie du système immunitaire. In : Pastoret P-P, Govaerts A., Bazin H (eds) *Immunologie animale. Médecine-Sciences Flammarion*, Paris 181-185.
298. Chun, J.J., Schatz, D.G., Oettinger, M.A., Jaenisch, R., Baltimore, D. (1991) The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system. *Cell* **64**, 189-200.
299. Breathnach, R., Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* **50**, 349-83.
300. Schaerlinger, B., Bascove, M., Fripiat, J.P. (2008) A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. *Mol Immunol* **45**, 776-86.
301. Griffiths, G.M., Berek, C., Kaartinen, M., Milstein, C. (1984) Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone. *Nature* **312**, 271-5.
302. Du Pasquier, L., Schwager, J., Flajnik, M.F. (1989) The immune system of xenopus. *Annual Review of Immunology* **7**, 251-275.
303. Bachl, J., Wabl, M. (1996) An immunoglobulin mutator that targets G.C base pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 851-5.
304. Hughes-Fulford, M., Sugano, E., Schopper, T., Li, C.F., Boonyaratanakornkit, J.B., Cogoli, A. (2005) Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits. *Cell Signal* **17**, 1111-24.
305. Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Ghosh, S. (1997) The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* **89**, 413-24.
306. Kuwahara, K., Fujimura, S., Takahashi, Y., Nakagata, N., Takemori, T., Aizawa, S., Sakaguchi, N. (2004) Germinal center-associated nuclear protein contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor in T cell-dependent responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1010-5.
307. 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**, 1007-18.
308. Infanger, M., Ulbrich, C., Baatout, S., Wehland, M., Kreutz, R., Bauer, J., Grosse, J., Vadrucci, S., Cogoli, A., Derradji, H., Neefs, M., Kusters, S., Spain, M., Paul, M., Grimm, D. (2007) Modeled gravitational unloading induced downregulation of endothelin-1 in human endothelial cells. *J Cell Biochem* **101**, 1439-55.
309. Grimm, D., Bauer, J., Kossmehl, P., Shakibaei, M., Schoberger, J., Pickenhahn, H., Schulze-Tanzil, G., Vetter, R., Eilles, C., Paul, M., Cogoli, A. (2002) Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells. *FASEB J* **16**, 604-6.
310. Kossmehl, P., Shakibaei, M., Cogoli, A., Infanger, M., Curcio, F., Schonberger, J., Eilles, C., Bauer, J., Pickenhahn, H., Schulze-Tanzil, G., Paul, M., Grimm, D. (2003) Weightlessness induced apoptosis in normal thyroid cells and papillary thyroid carcinoma cells via extrinsic and intrinsic pathways. *Endocrinology* **144**, 4172-9.

311. Maccarrone, M., Battista, N., Meloni, M., Bari, M., Galleri, G., Pippia, P., Cogoli, A., Finazzi-Agro, A. (2003) Creating conditions similar to those that occur during exposure of cells to microgravity induces apoptosis in human lymphocytes by 5-lipoxygenase-mediated mitochondrial uncoupling and cytochrome c release. *J Leukoc Biol* **73**, 472-81.
312. 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**, 1783-5.
313. Mognato, M., Girardi, C., Fabris, S., Celotti, L. (2009) DNA repair in modeled microgravity: double strand break rejoining activity in human lymphocytes irradiated with gamma-rays. *Mutat Res* **663**, 32-9.
314. Mognato, M., Celotti, L. (2005) Modeled microgravity affects cell survival and HPRT mutant frequency, but not the expression of DNA repair genes in human lymphocytes irradiated with ionising radiation. *Mutat Res* **578**, 417-29.
315. Kajioka, E.H., Andres, M.L., Li, J., Mao, X.W., Moyers, M.F., Nelson, G.A., Slater, J.M., Gridley, D.S. (2000) Acute effects of whole-body proton irradiation on the immune system of the mouse. *Radiat Res* **153**, 587-94.
316. Kajioka, E.H., Gheorghe, C., Andres, M.L., Abell, G.A., Folz-Holbeck, J., Slater, J.M., Nelson, G.A., Gridley, D.S. (1999) Effects of proton and gamma radiation on lymphocyte populations and acute response to antigen. *In Vivo* **13**, 525-33.
317. Tuscano, J.M., Druey, K.M., Riva, A., Pena, J., Thompson, C.B., Kehrl, J.H. (1996) Bcl-x rather than Bcl-2 mediates CD40-dependent centrocyte survival in the germinal center. *Blood* **88**, 1359-64.
318. Kamesaki, H., Zwiebel, J.A., Reed, J.C., Cossman, J. (1994) Role of bcl-2 and IL-5 in the regulation of anti-IgM-induced growth arrest and apoptosis in immature B cell lines. A cooperative regulation model for B cell clonal deletion. *J Immunol* **152**, 3294-305.
319. Du Pasquier, L., Flajnik, M.F., Hsu, E., Guet, C. (1985) Methods used to study the immune system of *Xenopus* (Amphibian, Anura). In *Immunological Methods*, Volume 3 Academic Press, Orlando, FL 425-465.
320. Wilson, M., Marcuz, A., du Pasquier, L. (1995) Somatic mutations during an immune response in *Xenopus* tadpoles. *Dev Immunol* **4**, 227-34.

Analysis of the immune system of an amphibian and of the effects of the environment on its humoral response

During my PhD, I have participated to the characterization of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) antibody heavy chains and to the discovery of a new isotype that we named IgP. I have also demonstrated that each antibody heavy chain has its human counterpart. *P. waltl* IgM are the counterpart of human IgM. IgY are expressed in mucosa and are therefore the physiological counterpart of human IgA. Finally, IgP are predominantly expressed in larvae and are less diverse than IgM. These two characteristics are shared with antibodies produced by mammalian B1 cells.

These studies allowed me to approach the effects of a long term spaceflight on the humoral immune response, i.e. the antibody mediated response, which up to now has been poorly studied. The Development and Immunogenetics team, JE 2537, has immunized adult *P. waltl* during their five month stay onboard the Mir space station and showed that heavy chain variable domains of specific IgM are encoded by genes belonging to the VHII and VHVI families. However, these families are used in different proportions in animals immunized onboard Mir by comparison to animals immunized on Earth. To better understand this difference, I have determined how these animals use their individual VHII and VHVI genes. My work revealed that only one VHII gene and four VHVI genes (A, B, C and D) are used by immunized animals. I observed an increase in the expression of IgM heavy chain mRNAs encoded by the VHII, VHVI.C and VHVI.D genes and a strong decrease in the expression of IgM heavy chain mRNAs encoded by the VHVI.A and VHVI.B genes in spaceflight animals, demonstrating that this environment affects the humoral response. These observations may be due to a change in B-cell selection under spaceflight conditions.

Furthermore, I described for the first time the effects of spaceflight on somatic hypermutations. I isolated and characterized the *P. waltl* mRNA coding for the main effector of these mutations: the activation-induced cytidine deaminase (AID). I demonstrated that this protein is present and conserved in *P. waltl*. Then, I described somatic hypermutations in *P. waltl*. I mapped somatic hypermutations, studied their distribution and calculated their frequency in animals immunized on Earth and in animals immunized onboard the Mir space station. This work revealed a strong depression of somatic hypermutations in animals immunized onboard Mir. This observation does not result from a change in AID transcription. We believe that this may be the consequence of a lower B lymphocyte survival under spaceflight conditions.

Keywords: Humoral immunity, antibody heavy chains, spaceflight, somatic hypermutations, VH gene, activation-induced cytidine deaminase, urodele amphibian.

Etude du système immunitaire d'un amphibien et analyse des effets de l'environnement sur sa réponse humorale

Durant ma thèse, j'ai participé à la caractérisation des isotypes de chaînes lourdes d'anticorps chez le pleurodèle (*Pleurodeles waltl*, amphibien urodèle) et à la mise en évidence d'un nouvel isotype d'anticorps : les IgP. J'ai également montré que chaque chaîne lourde a son équivalent humain. Les IgM du pleurodèle sont l'équivalent des IgM humaines. Les IgY sont exprimées principalement au niveau des muqueuses tout comme les IgA humaines. Enfin, les IgP sont observées majoritairement chez les larves et ont une diversité plus faible que les IgM. Ces deux caractéristiques sont partagées avec les anticorps produits par les cellules B1.

Ces travaux m'ont ensuite permis d'aborder l'impact d'un séjour de longue durée dans l'espace sur la réponse immunitaire humorale, c'est-à-dire la réponse médiée par les anticorps qui, jusqu'à présent, a été très peu étudiée. L'équipe Développement et Immunogénétique, JE 2537, a immunisé des pleurodèles lors d'un séjour de 5 mois à bord de la station spatiale Mir et a montré que les chaînes lourdes d'IgM produites en réponse à la stimulation antigénique sont fabriquées à partir de gènes des familles VHII et VHVI. Cependant ces familles sont utilisées dans des proportions différentes chez les animaux immunisés dans Mir. Mes travaux ont permis d'approfondir ces résultats par une étude des gènes VHII et VHVI utilisés dans ces chaînes lourdes. J'ai ainsi montré qu'un seul gène VHII et quatre gènes VHVI (A, B, C et D) sont utilisés par les animaux immunisés. Les gènes VHII, VHVI.C et VHVI.D sont plus exprimés chez les animaux immunisés dans Mir alors que l'expression des gènes VHVI.A et VHVI.B est fortement diminuée chez ces mêmes animaux. Ces résultats démontrent clairement que le séjour dans Mir a affecté la réponse immunitaire humorale de ces animaux. Ces observations pourraient résulter d'un changement de la distribution et de sélection des lymphocytes B dans l'espace.

Par ailleurs, j'ai décrit pour la première fois les effets d'un séjour dans l'espace sur les hypermutations somatiques. Avant d'étudier ce phénomène, j'ai isolé et caractérisé chez le pleurodèle l'ARNm codant l'effecteur indispensable pour ces mutations : la protéine AID (activation-induced cytidine deaminase). J'ai ainsi montré que cette protéine est bien présente et conservée dans cette espèce. J'ai ensuite mis en évidence et caractérisé pour la première fois le phénomène des hypermutations somatiques chez le pleurodèle. Pour cela, j'ai étudié les profils des mutations observées, cartographié ces dernières et calculé leur fréquence. Ces différents critères ont été comparés entre les animaux immunisés sur Terre et les animaux immunisés à bord de la station Mir. Ainsi, j'ai pu montrer que la fréquence des hypermutations somatiques est diminuée chez les pleurodèles immunisés dans Mir. Cette diminution n'est pas due à un changement de la transcription d'AID mais pourrait être due à une diminution de la survie des lymphocytes B dans l'espace.

Mots clés: immunité humorale, chaînes lourde d'anticorps, vol spatial, hypermutations somatiques, gène VH, activation-induced cytidine deaminase, amphibien urodèle.