



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BioSE**



**STRESS IMMUNITÉ  
PATHOGÈNES**

Ecole doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)  
Laboratoire SIMPA (Stress-Immunité-Pathogènes)

## **Thèse**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

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

par **Pauline JACOB**

**Sous la direction du Pr. Jean-Pol FRIPPIAT et du Dr. Stéphanie  
GHISLIN**

**Impact de conditions environnementales extrêmes sur les  
répertoires d'anticorps murins et humains et définition de  
nouveaux biomarqueurs**

**Soutenue le 18.12.2024**

### **Membres du jury :**

<b>Directeur(s) de thèse :</b>	<b>M. Jean-Pol FRIPPIAT</b>	<b>Professeur des Universités, UR SIMPA, Université de Lorraine, Nancy (directeur de thèse)</b>
	<b>Mme Stéphanie GHISLIN</b>	<b>Ingénieure, UAR 2AD, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris (co-directrice de thèse)</b>
<b>Président de jury :</b>	<b>M. Eric TSCHIRHART</b>	<b>Professeur des Universités, Département des Sciences de la Vie et de la Médecine, Université du Luxembourg, Esch-sur-Alzette</b>
<b>Rapporteurs :</b>	<b>Mme Sylvie FOURNEL</b>	<b>Professeure des Universités, INSERM, UMR _S 1121, Université de Strasbourg, Strasbourg</b>
	<b>M. David DUBAYLE</b>	<b>Maitre de Conférences, CNRS, UMR 8002, Université Paris Cité, Paris</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>M. Eric TSCHIRHART</b>	<b>Professeur des Universités, Département des Sciences de la Vie et de la Médecine, Université du Luxembourg, Esch-sur-Alzette</b>
	<b>M. Jonathan POL</b>	<b>Chargé de Recherche INSERM, INSERM U1138, Université Paris-Saclay, Paris</b>
<b>Membres invités :</b>	<b>Mme Anne VANET</b>	<b>Professeure des Universités, CNRS, UMR7592, Université Paris Cité, Paris</b>
	<b>Mme Guillemette GAUQUELIN-KOCH</b>	<b>Docteur, Responsable des Sciences de la Vie CNES, Paris</b>





*“Gratitude is the most important of all human emotions.”*

*Hans Selye*



*A mes parents,*



## Remerciements

Vous savez, je ne pense pas qu'il y ait de bons ou de mauvais remerciements de thèse. Si je devais résumer ma thèse avec vous aujourd'hui, je dirais que c'est d'abord des rencontres, des gens qui m'ont tendus une pipette, peut-être à un moment où je ne pouvais pas, où je cherchais ma voie. Et c'est assez curieux de se dire que les hasards, les manip, la science et les rencontres forgent une destinée. Parce que quand on a le goût de la science, parfois on ne trouve pas d'interlocuteurs en face, je dirais, le miroir qui vous aide à avancer. Alors ce n'est pas mon cas comme je le disais là puisque moi au contraire, j'ai pu et je leur dis merci.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres de mon jury qui ont accepté et pris le temps d'évaluer mon travail. Un immense merci au Pr. Fournel qui a aussi fait partie de mon comité de suivi, au Pr. Dubayle, au Pr. Tschirhart et au Dr. Pol. Je remercie également le Dr. Dubois-Pot-Schneider qui a fait partie de mon comité de suivi et m'a suivi tout au long de ma thèse. Merci au Pr. Vanet, merci Anne pour votre investissement dans ces projets puisque sans vos codes de tri, je n'aurais jamais eu de résultats. Merci à vous, Dr. Gauquelin-Koch et au CNES pour vos soutiens sur mes différents projets.

Je remercie également le ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et l'Innovation, l'Université de Lorraine et l'école doctorale BioSE pour avoir rendu cette recherche possible.

Au Pr. Chouker, filen danke ! Merci pour les échantillons et votre aide sur le projet CHOICE. Merci aux Pr. Custaud et Dr. Navasiolava pour m'avoir transmis les données des études Vivaldi et votre aide. Je remercie également Mme Sandrine Koechler de la plateforme de séquençage de Strasbourg. Merci Sandrine pour tout le temps que tu as passé à m'expliquer le NGS en long, en large et en travers ainsi que pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Je remercie le Pr. Lozniewski, le directeur de notre unité pour son soutien.

Au Professeur Fripiat, mon directeur de thèse. S'il y a quelques années quelqu'un m'avait dit : « tu feras une thèse avec M. Fripiat », je ne l'aurais pas cru et je me serais effondrée de peur. J'ai bien rapidement vu que ce n'était pas le cas, que vous ne faites pas peur (pas vraiment). L'expression de mes remerciements ne sera jamais



assez grande pour vous montrer à quel point je vous suis reconnaissante de tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous remercie d'avoir su me faire confiance pour me confier des projets à gérer toute seule, d'avoir écouté mes idées et d'avoir cru en moi pour que j'avance autant en tant que scientifique. Travailler avec vous a été formateur et franchement bien SIMPA. Je vous remercie également pour nos road-trips Allemands et Dubaïotes où j'ai passé d'excellents moments avec vous et où nous avons bien rigolé. Je tiens également à vous dire que j'ai toujours votre poulet avec ses lunettes de soleil ou est marqué : « le chef voit tout » et les montages que vous m'avez fait et que je garderais bien précieusement en souvenir. Merci du fond du cœur pour tout, cela a été un honneur d'être votre étudiante et d'avoir appris à vos côtés.

Au Dr. Ghilini, ma directrice de thèse. Stéphanie, je ne pense pas que vous vous rendiez compte à quel point vos conseils et vos encouragements m'ont permis de me former en tant que scientifique. J'ai l'impression que tout ce que je sais, tous mes réflexes et ma rigueur, je vous le dois. À mes yeux, vous resterez toujours : « celle qui sait tout » et merci de m'avoir appris à être comme ça, d'avoir toujours eu confiance en moi et de n'avoir jamais douté que j'y arriverais : « Mais Pauline, il reste une semaine, laaaaaarge ». Je pense sincèrement que nous avons eu de sacrées aventures, épopées si je puis dire, que ce soit lors de nos aventures Montpelliéraines, nos grands moments de réflexion sur mes données à s'en casser le cerveau ou encore nos fameux moments eurêka. Je dois quand même dire que le : « Viens Pauline, foutu pour foutu, on jette le tube dans l'azote liquide » reste l'un des moments les plus étonnants. Merci pour tout, merci pour votre bonne humeur et nos séances papotages qui m'ont motivé à terminer. Je suis fière d'avoir appris à vos côtés et d'avoir été votre étudiante.

À Julie, l'autre moitié qui constitue le package des minettes. Depuis que je suis arrivée au laboratoire, tu as été un véritable coup de cœur, toujours bienveillante, toujours adorable et toujours solaire comme tu sais si bien l'être. De collègues, à work bestie et bestie ; je suis si contente de te compter parmi mes amies les plus précieuses. Je te remercie du fond du cœur pour ton soutien du début à la fin, d'avoir été là quand j'avais besoin, quand on faisait les beyblades ou encore pour faire le cirque au laboratoire. Je finirais ces remerciements sur une phrase philosophique qui nous caractérise si bien : « mais ptdr t ki ? un café ça te dit ? »

Armelle, je mentirais si je ne te disais pas que ma passion pour l'immunologie, c'est en partie grâce à toi et à ta bonne humeur pendant les cours. Cela fait maintenant quelques années que tu me connais et que tu m'encourages et me soutiens à 1000%. Je te remercie du fond du cœur pour ton inconditionnel soutien et tes bons conseils !



Je tiens également à remercier Anne-Lyse ; merci pour ton aide, ton écoute tout au long de cette thèse et d'être toujours partante pour boire un petit caf à n'importe quel moment ! Merci à toi, Lisiane, pour ta gentillesse et ta bienveillance ; ton soutien m'a beaucoup touché. Merci à vous Patricia, d'avoir toujours été si rapide et efficace dans les nombreuses missions que vous avez dues me booker ; j'espère que je ne vous ai pas rendu trop folle avec tout ça. Merci à Jordan et Gaetano pour leur soutien et qui ont depuis un certain temps quitter le nid du labo SIMPA. Je remercie évidemment tous les membres du laboratoire SIMPA pour leurs conseils et leurs soutiens tout au long de cette aventure.

La thèse ce n'est pas que le laboratoire, ce sont aussi les amis qui rappellent que la vie existe et qu'il faut respirer et que ça va le faire !

Un énorme merci à Pauline, Anne-Claire, Mortecouille (Noémie), Mélissa (ma binôme), la pitchoune (Alizée), Amaël, Charlotte, Lisa, Brice, Coralie, Caro et Sylvain pour votre soutien sans failles et de n'avoir jamais, mais au grand jamais, été soulé quand je faisais l'éolienne à grande vitesse parce que j'étais en panique, et d'avoir eu les bons mots pour m'encourager et me rassurer. Un merci tout spécial à Pauline qui m'a subi pendant mes 2 mois et demi de rédaction pour éviter que je ne me sente trop seule et qu'on soit sûre qu'on travaillait toutes les deux.

Merci de m'avoir écouté, de m'avoir emmené boire des petits caf ou faire des petits restos pour me rappeler que oui, une thèse ça se finit un jour et que ça va aller, ça va bien se passer. Mes mots ne seront pas assez forts pour vous remercier les amis qui m'ont encouragé dès le début et ont toujours cru en moi ! Du fond du cœur, merci beaucoup.

Je tiens également à remercier Jean-Marc et Marie-Anne, mes beaux-parents, merci pour toutes les fois où vous m'avez écouté, soutenu et rassuré. Votre soutien m'a beaucoup touché. J'ai beaucoup de chance de vous avoir.

Merci à Jean-Hugues pour tout. Merci pour ton inébranlable de soutien et d'avoir cru en moi, quand je ne le faisais pas et que j'avais des immenses moments de doutes, tu as été là, patient à m'écouter pendant des heures. Merci de m'avoir supporté pendant ces 3 ans, ce qui n'a pas dû être facile, et cela depuis le 1<sup>er</sup> jour. Tu ne m'as jamais lâché, ni douté que j'y arriverais, j'ai tellement de chance de t'avoir dans ma vie et pour tout ce que tu as fait et fais encore pour moi, merci du fond du cœur.



Le soutien vient aussi de ma famille que je me dois de remercier comme il se doit. Mamie D, je ne pense pas me tromper en disant que tu serais sûrement fière de moi. Papy et Mamie, je sais que vous ne comprenez pas toujours ce que je raconte mais merci d'avoir toujours suivis assidument mes études, mes publications et d'avoir été si contents et si fiers. Mamie, je sais que l'une des anecdotes que tu préfères raconter est celle où petite, je vous disais à papy et toi : « t'inquiètes pas, je gère » ; j'espère que je ne vous aurais pas déçu et que j'aurais géré tout ça comme il se doit.

Enfin, je remercie ceux qui m'ont permis d'en arriver jusque-là : mes parents. Sans votre soutien et vos encouragements, je n'aurais jamais réussi et je vous dois tous ces accomplissements. Vous m'avez donné tous les moyens pour y arriver et appris à ne jamais lâcher le morceau même quand cela devenait dur. Je ne serais jamais assez reconnaissant de tout ce que vous m'avez appris et de ce que vous avez fait pour moi. Papa, Maman, j'espère que vous serez aussi fière du travail que je vous présente que je suis fière d'être votre fille.

À vous tous qui avez pu m'aider au cours de ces trois années et à ceux que j'ai pu oublier par mégarde,

Un immense merci.

Pauline



# Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS .....	6
LISTE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES FIGURES.....	10
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	11
I.    LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	11
1.    Généralités.....	11
1.1.    Définitions .....	11
1.2.    L'immunité innée.....	11
1.2.1.    Les acteurs de l'immunité innée .....	11
1.2.2.    Déroulement de la réponse immunitaire innée .....	12
1.3.    L'immunité adaptative.....	12
1.3.1.    Généralités.....	12
1.3.2.    Lymphocytes et réponse immunitaire adaptative .....	13
1.3.2.1.    Les lymphocytes T .....	13
1.3.2.2.    Les lymphocytes B .....	14
1.3.2.3.    Déroulement de la réponse immunitaire adaptative.....	15
2.    LYMPHOCYTE B .....	16
2.1.    Le BCR, récepteur à l'antigène.....	16
2.1.1.    Structure du BCR .....	17
2.1.2.    Les classes d'immunoglobulines .....	17
2.2.    Recombinaison V(D)J .....	18
2.2.1.    Aspects génétiques.....	18
2.1.3 Choix des segments V, D et J.....	19
2.2.2.    Mécanismes moléculaires de la recombinaison V(D)J.....	19
2.2.2.1.    Première étape : clivage de l'ADN.....	19
2.2.2.1.1.    RSS et règle 12/23 .....	19
2.2.2.1.2.    Complexe RAG1/2 et clivage de l'ADN.....	20



2.2.2.2.	Deuxième étape : Réparations de l'ADN.....	21
2.2.2.2.1.	Voie canonique dans la recombinaison V(D)J et finalisation de la réparation.....	21
2.2.2.2.2.	Voie alternative dans la recombinaison V(D)J.....	22
2.2.2.3.	Diversité de jonction.....	22
2.2.3.	Régulations moléculaires de la recombinaison V(D)J.....	23
2.2.3.1.	Les séquences RSS.....	23
2.2.3.2.	Régulations des protéines RAG.....	24
2.2.3.2.1.	Régulation transcriptionnelle.....	24
2.2.3.2.2.	Régulation de l'activité.....	24
2.2.3.2.3.	Régulation de la dégradation.....	25
2.2.3.3.	Régulations de la chromatine.....	25
2.2.3.3.1.	Rapprochement de séquences éloignées et formation de boucles.....	25
2.2.3.3.2.	Modifications post-traductionnelles des histones.....	26
2.2.3.3.3.	Relocalisation nucléaire.....	27
2.2.3.4.	Exclusion allélique.....	27
2.2.3.5.	Régulation de la recombinaison du locus IGK.....	28
2.3.	Lymphopoïèse B.....	28
2.3.1.	Généralités.....	28
2.3.2.	Stades de développement.....	29
2.3.3.	Régulation de la lymphopoïèse B.....	30
2.3.4.	Sélection des lymphocytes B.....	31
2.3.4.1.	Sélection par le pré-BCR.....	31
2.3.4.2.	Sélection par le BCR.....	32
2.4.	Amélioration du BCR.....	33
2.4.1.	La commutation de classe.....	33
2.4.2.	Les hypermutations somatiques.....	34
II.	LE STRESS.....	34
1.	Généralités.....	34
1.1.	Historique.....	34



1.2.	Définitions .....	35
2.	Mécanismes de réponses au stress.....	36
2.1.	Système sympathique, phase d'alarme .....	36
2.2.	Axe hypothalamo-hypophyso-surranélien, phases de résistance et d'épuisement .....	36
2.2.1.	Mécanisme d'action de l'axe hypothalamo-hypophyso-surranélien (HSS) .....	36
2.2.1.	Régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surranélien (HSS) .....	37
3.	Impact du stress sur le système immunitaire.....	38
3.1.	Stress aigu.....	38
3.2.	Stress chronique.....	39
III.	EXPOSOME SPATIAL.....	41
1.	Généralités.....	41
1.1.	Stress physiques.....	41
1.2.	Stress socio-environnementaux.....	43
2.	Effets de l'exposome spatial sur l'organisme .....	44
3.	Effets de l'exposome spatial sur le système immunitaire.....	45
3.1.	Effets sur le système immunitaire inné .....	45
3.2.	Effets sur le système immunitaire adaptatif .....	46
IV.	MODELES DE L'EXPOSOME SPATIAL.....	48
1.	Modèles d'étude la microgravité simulée sur des organismes complexes (souris et Homme) ....	48
1.1.	Modèle murin d'hypokinésie des membres postérieurs (Hindlimb-Unloading) .....	48
1.1.	Modèles humains .....	49
1.1.1.	Dry-immersion .....	49
1.1.2.	Head down tilt Bed-rest.....	50
1.2.	Comparaison des différents modèles .....	50
2.	Modèles d'analogues terrestres de l'exposome spatial chez l'Homme hors gravité.....	51
2.1.	NEEMO.....	52
2.2.	L'île de Devon en Arctique .....	52
2.3.	Antarctique .....	53
2.3.1.	Concordia.....	53



2.3.2.	Neumayer III .....	54
2.4.	Comparaison des différents modèles : avantages et inconvénients.....	54
V.	PROBLEMATIQUES.....	56
1.	Objectif 1 : Etude de l'impact de différentes combinaisons de stress rencontrés lors de vols spatiaux sur les répertoires BCR murin et humain .....	56
1.1.	Etude de l'impact de la microgravité sur le répertoire BCR murin .....	56
1.2.	Etude de l'effet d'environnements extrêmes sur le répertoire BCR humain.....	57
2.	Objectif 2 : Utilisation des biomarqueurs NLR, GLR et PLR pour évaluer le statut immunitaire et de santé dans différents modèles d'études.....	58
2.1.	Intérêt des ratios NLR, GLR et PLR dans un modèle de microgravité simulée, le head-down tilt bed-rest58	
2.2.	Confirmation de l'intérêt des ratios NLR, GLR et PLR pour le monitoring du statut de santé des astronautes dans un modèle de microgravité simulée, la dry-immersion.....	58
CHAPITRE II : RESULTATS.....		59
I.	Etude de l'impact de la microgravité sur le répertoire BCR murin .....	59
II.	Etude de l'effet d'environnements extrêmes sur le répertoire BCR humain.....	83
III.	Intérêt des ratios NLR, GLR et PLR dans un modèle de microgravité simulée, le head-down tilt bed-rest 128	
IV.	Confirmation de l'intérêt des ratios NLR, GLR et PLR pour le monitoring du statut de santé des astronautes dans un modèle de microgravité simulée, la dry-immersion.....	141
I.	Effet des stress sur le répertoire d'anticorps .....	172
1.	Effets des stress sur la recombinaison V(D)J .....	172
2.	Cohérence des résultats avec la théorie du 'spaceinflammageing' .....	173
3.	Effets individus-dépendants.....	174
II.	Impact sur le nombre de cellules.....	174
1.	Impact sur le nombre de lymphocytes B.....	174
2.	Impact sur les neutrophiles, plaquettes et lymphocytes.....	175
III.	Impact sur l'hématopoïèse.....	175
IV.	Structure osseuse .....	177
1.	Perte osseuse et conséquences .....	177



2.	Résorption osseuse et vieillissement.....	177
V.	Stress et effets psychologiques.....	178
VI.	Statut immunitaire .....	179
1.	Neutrophiles .....	179
2.	Lymphocytes B et répertoire d'anticorps.....	179
CHAPITRE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....		181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....		185
ANNEXE 1.....		204



## LISTE DES ABREVIATIONS

- **0 G** = Microgravité
- **11 $\beta$ -HSD1** = enzyme 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1
- **11 $\beta$ -HSD2** = enzyme 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2
- **aa** = Acides aminées
- **Ac** = Anticorps
- **ACTH** = Hormone Corticotrope
- **Ag** = Antigène
- **ALP** = All-Lymphoid Progenitor
- **Alt-NHEJ** = Voie alternative Non-Homologous End Joining
- **BCR** = B Cell Receptor
- **BDC** = Baseline Data Collection
- **BLP** = B cell biased Lymphoid Progenitor
- **C** = Domaine Constant
- **CD** = Cluster de différenciation
- **CDR** = Complementary Determining Region
- **CH / CL** = Domaine Constant de la chaîne lourde (H) et de la chaîne légère (L)
- **CLR** = C-type Lectin Receptors
- **CMH** = Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- **CNES** = Centre National d'Etudes Spatial
- **C-NHEJ** = Voie canonique Non-Homologous End Joining
- **CPA** = Cellules Présentatrices d'Antigène
- **CRH** = Corticolibérine
- **CSH** = Cellule Souche Hématopoïétique
- **CSR** = Class Switch Recombination
- **CTCF** = CCCTC-binding Factor
- **CtIP** = carboxy-terminal binding - interacting protein
- **CXCL-10** = C-X-C motif chimiokine ligand 10
- **D** = Diversity
- **DAMP** = Damage Associated Molecular Pattern
- **DC** = Cellule Dendritique
- **DI** = Dry-Immersion



- **DNA-PKcs** = DNA-dependent Protein Kinase
- **DSB** = Double-Strand breaks
- **ESA** = European Space Agency / Agence Spatiale Européenne
- **EVA** = Sorties extravéhiculaires
- **FdT** = Facteur de Transcription
- **Fr** = Framework
- **GC** = Glucocorticoïdes
- **GLR** = Granulocyte to Lymphocyte ratio / Ratio Granulocyte sur Lymphocyte
- **GR** = Récepteurs aux glucocorticoïdes
- **GRE** = Glucose Response Elements
- **H** = Heavy / lourde
- **HDTBR** = Head-down tilt Bed rest
- **HMBG** = High Mobility Group Protein
- **HSS** = Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
- **IC** = Intervalle de Confiance
- **IFN- $\gamma$**  = Interféron-gamma
- **Ig** = Immunoglobuline
- **IgH** = Locus codant pour la chaîne lourde
- **IgL** = Locus codant pour la chaîne légère
- **IL-X** = Interleukine-X
- **ITAM** = Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
- **J** = Joining
- **L** = Light / légère
- **LB** = Lymphocyte B
- **Lig X** = Ligase X
- **LPS** = Lipopolysaccharides
- **LT** = Lymphocyte T
- **LTc** = Lymphocyte T Cytotoxique
- **LTh** = Lymphocyte T Helper ou auxiliaire
- **MAI** = Maladies auto-immunes
- **MC2-R** = Récepteurs aux mélanocortines
- **MPP** = cellules Progénitrices Multipotentes
- **MR** = Récepteurs aux minéralocorticoïdes
- **Mre11** = Meiotic recombination 11
- **Nbs1** = phosphopeptide-binding Nijmegen breakage syndrome protein 1



- **NGS** = Next-Generation Sequencing
- **NHEJ** = Non-Homologous End Joining
- **NK** = Natural Killer
- **NLR** = Neutrophil to Lymphocyte Ratio / Ratio Neutrophile sur Lymphocyte
- **nt** = nucléotides
- **PAMP** = Pathogen Associated Molecular Pattern
- **PARP** = Poly(ADP-ribose) polymérase
- **pb** = paires de bases
- **PCR** = Polymerase Chain Reaction
- **PLC** = Progénitrices Lymphoïdes Communes
- **PLR** = Platelet to Lymphocyte Ratio / Ratio Plaquette sur Lymphocyte
- **pol** = polymérase
- **PRR** = Pattern Recognition Receptor
- **Rad50** = ATP-binding cassette ATPase
- **RAG** = Recombination Activating Gene
- **RPA** = Replication Protein A
- **RPA** = Replication protein A
- **RSS** = Recombination Signal Sequence
- **SCD-1** = Stromal cell Derived Factor 1
- **SCF** = Stem Cell Factor
- **SHM** = Somatic HyperMutations / Hypermutations Somatiques
- **SI** = Système immunitaire
- **SN** = Système Nerveux
- **SNC** = Système Nerveux Central
- **TCM** = les cellules T de Mémoire Centrale
- **TCR** = T Cell Receptor
- **TdT** = Terminal Déoxynucléotidyl Transférase
- **TEM** = les cellules T de Mémoires Effectrices
- **TGF- $\beta$**  = Tumor Growth Factor Beta
- **TNF- $\alpha$**  = Tumor Necrosis Factor alpha
- **Treg** = Lymphocyte T régulateur
- **V** = Variable
- **VH / VL** = Domaine Variable de la chaîne lourde (H) et de la chaîne légère (L)
- **XLF** = XRCC4- like factor
- **XRCC4** = X-ray Cross Complementing Group 4



## LISTE DES TABLEAUX

- **Tableau 1** : Présentation générale des cellules du système immunitaire innée et de leurs principales fonctions.
- **Tableau 2** : Résumé des fonctions effectrices des différents isotypes d'anticorps.
- **Tableau 3** : Localisations chromosomiques des segments géniques codant pour les chaînes lourdes et légères du BCR chez l'Homme et la souris.
- **Tableau 4** : Nombre de segments géniques totaux et fonctionnels (F) dans les loci codant pour les chaînes lourdes et légères du BCR chez l'Homme et la souris.
- **Tableau 5** : Répartition par famille des segments V, D et J en codant pour les chaînes lourdes et légères du BCR chez l'Homme et la souris.
- **Tableau 6** : Similarités et différences entre l'espace et les analogues d'environnements extrêmes terrestres.
- **Tableau 7** : Récapitulatif des résultats obtenus comparés à ceux des cosmonautes (cos).



## LISTE DES FIGURES

- **Figure 1** : Déroulement de la réponse immunitaire innée, cas d'une lésion cutanée.
- **Figure 2** : Localisation des organes lymphoïdes primaires et secondaires dans l'organisme humain.
- **Figure 3** : Déroulement de la réponse immunitaire adaptative.
- **Figure 4** : Représentation schématique de la structure du récepteur à l'antigène des lymphocytes B (BCR) de type IgM.
- **Figure 5** : Exemple de structure 3D du site de liaison à l'anticorps d'une immunoglobuline.
- **Figure 6** : Présentation schématique de l'organisation des loci IGH, IGK et IGL chez l'Homme.
- **Figure 7** : Représentations schématiques des séquences signales de recombinaison (RSS) et des associations des V, D et J lors de la recombinaison V(D)J).
- **Figure 8** : Etape 1 de la recombinaison V(D)J : clivage de l'ADN, exemple de la chaîne légère.
- **Figure 9** : Etape 2 de la recombinaison V(D)J : réparation de l'ADN, exemple de la chaîne légère.
- **Figure 10** : Transcrit du BCR obtenu après la recombinaison V(D)J, exemple de la chaîne lourde.
- **Figure 11** : Représentation schématique de la diversité obtenue par la recombinaison V(D)J.
- **Figure 12** : Organisation du nucléosome et structure en rosette du locus IgH.
- **Figure 13** : Aperçu général des différenciations possibles d'une cellule souche hématopoïétique.
- **Figure 14** : Représentation schématique de la lymphopoïèse B.
- **Figure 15** : Fonctionnement et régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HSS).
- **Figure 16** : Les différents types de stress rencontrés par les astronautes.
- **Figure 17** : Impact de l'exposome spatial sur l'organisme d'un astronaute.
- **Figure 18** : Effets des stress associés aux vols spatiaux sur le nombre, le développement et la fonction des cellules immunitaires.
- **Figure 19** : Présentation des analogues de la microgravité simulée.
- **Figure 20** : Localisation et présentation des environnements extrêmes terrestres servant d'analogue de l'exposome spatiale.

Cellules	Fonctions
Mastocyte	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reconnaît des molécules associées aux pathogènes (PAMP).</li> <li>▪ Possède des granules contenant des médiateurs chimiques tel que l'histamine impliquée dans la vasodilatation des vaisseaux sanguins facilitant l'arrivée d'autres cellules immunitaires sur le site de l'infection.</li> </ul>
Monocyte Macrophage	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Le macrophage est la forme tissulaire du monocyte qui est la forme circulante.</li> <li>▪ Reconnaît des molécules associées aux pathogènes (PAMP).</li> <li>▪ Phagocyte et dégrade les pathogènes ou les cellules infectées via l'action de leurs lysosomes.</li> <li>▪ Stimule les autres cellules immunitaires via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines, et la présentation de l'Ag.</li> </ul>
Neutrophile	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reconnaît des molécules associées aux pathogènes (PAMP).</li> <li>▪ Phagocyte et dégrade les pathogènes via l'action de vésicules contenant des agents microbicides.</li> </ul>
Cellule dendritique	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reconnaît des molécules associées aux pathogènes (PAMP).</li> <li>▪ Phagocyte les pathogènes.</li> <li>▪ Présente des peptides antigéniques aux autres cellules immunitaires et migre vers les organes lymphoïdes secondaires pour activer la réponse immunitaire adaptative si nécessaire.</li> </ul>
Natural Killer	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reconnaît les cellules infectées ou cancéreuses.</li> <li>▪ Lyse les cellules infectées ou cancéreuses par leur pouvoir cytotoxique (système granzymes/perforines).</li> </ul>

**Tableau 1 : Présentation générale des cellules du système immunitaire innée et de leurs principales fonctions.**

Source : *Topham and Hewitt, 2009 ; Geissman et al., 2010.*

# CHAPITRE I : INTRODUCTION

## I. LE SYSTEME IMMUNITAIRE

### 1. Généralités

#### 1.1. Définitions

Le système immunitaire (SI) se définit comme le système de défense de l'organisme contre le « non-soi » formé par les agents pathogènes et les molécules étrangères appelées antigènes (Ag). Il est complexe et communique avec tous les systèmes de l'organisme. Il peut lutter contre des agents extérieurs tels que des virus, bactéries, champignons ou parasites mais il discrimine aussi le soi du soi altéré, c'est-à-dire distinguer les cellules fonctionnelles/saines (« le soi ») des cellules dysfonctionnelles (« le soi altéré »), comme les cellules cancéreuses ou les brûlures. Cette reconnaissance du « non-soi » et du « soi altéré » permet la mise en place d'une réponse immunitaire protégeant l'hôte de façon optimale (Chaplin, 2010). Au cours de l'évolution, deux types d'immunités se sont mises en place : l'immunité innée (dont l'action est immédiate et non spécifique à l'antigène) et l'immunité adaptative (dont la mise en place est plus tardive et spécifique à l'antigène) trouvée chez les gnathostomes (vertébrés à mâchoires). Ainsi la réponse immunitaire se déroule en deux temps. Tout d'abord l'immunité innée est activée et si celle-ci est insuffisante pour détruire l'antigène, l'immunité adaptative prend le relais. Ces deux immunités possèdent des caractéristiques qui leurs sont propres.

#### 1.2. L'immunité innée

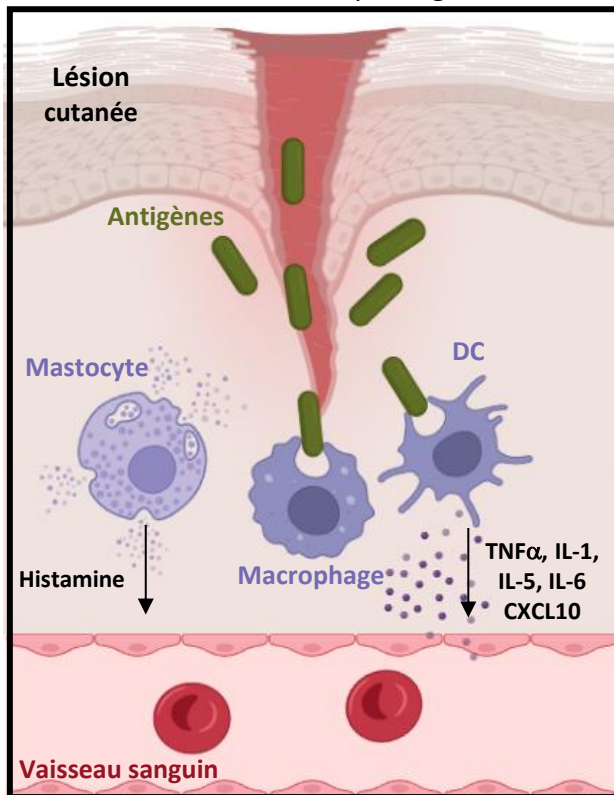
##### 1.2.1. Les acteurs de l'immunité innée

Les premiers acteurs de l'immunité innée sont les barrières physico-chimiques qui vont empêcher les pathogènes d'entrer dans l'organisme. Parmi celles-ci, on trouve la peau et les muqueuses qui constituent les principales voies d'entrées des pathogènes dans l'organisme.

Dans le cas de la peau, l'épiderme kératinisé constitue une barrière efficace contre les pathogènes, renforcée par les substances chimiques produites par les glandes sébacées qui acidifient le pH de la peau et limitent ainsi la survie des pathogènes à sa surface. De plus, le processus de desquamation constitue un moyen efficace d'éliminer les pathogènes présent à la surface de la peau.

Dans le cas des muqueuses (respiratoires, intestinales et uro-génitales) le mucus sécrété piège les pathogènes qui sont ensuite éliminés grâce aux cellules ciliées présentes à la surface des muqueuses.

Déroulement de la réponse immunitaire innée, détection du pathogène :



Élimination du pathogène par l'immunité innée :

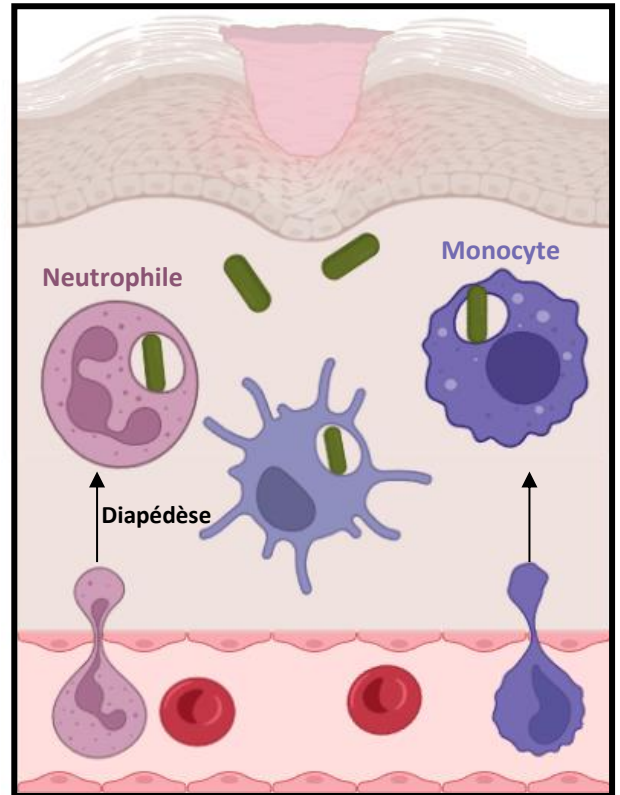


Figure 1 : Déroulement de la réponse immunitaire innée, cas d'une lésion cutanée.

Une lésion cutanée représente une des voies majeures d'entrées des pathogènes dans l'organisme. Dès l'entrée des pathogènes dans l'organisme, la réponse immunitaire innée se met en place. Les pathogènes sont détectés par les cellules sentinelles (mastocyte, macrophage et DC) qui vont s'activer. Les mastocytes vont sécréter de l'histamine, vasodilatateur permettant d'augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins. Les macrophages et DC vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires et chimiokines qui vont notamment attirer les neutrophiles et les monocytes sur le site de l'inflammation. L'action vasodilatatrice de l'histamine facilite l'entrée de ces cellules sur le site de l'inflammation par diapédèse. Une fois sur place, les cellules immunitaires vont phagocyter le pathogène et l'éliminer. Si la réponse immunitaire innée n'est pas suffisante, c'est alors la réponse immunitaire adaptative qui se met en place.

En plus des barrières physico-chimiques, des cellules spécifiques interviennent dans l'immunité innée dont les noms et fonctions sont résumés dans le Tableau 1.

### **1.2.2. Déroulement de la réponse immunitaire innée**

Lors de l'entrée d'un pathogène dans l'organisme par la peau et/ou les muqueuses, la réponse immunitaire innée se met en place. Le pathogène va être tout d'abord reconnu par les cellules sentinelles (macrophages, NK, monocytes, mastocytes, cellules dendritiques (DC)) via leurs récepteurs membranaires de la famille des PRR (Pattern Recognition Receptors). Ceux-ci reconnaissent des motifs moléculaires présents à la surface des pathogènes nommés PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) ou des motifs de signaux endogènes associés à un stress cellulaire nommés DAMP (Damage Associated Molecular Pattern).

Cette reconnaissance va induire l'activation des cellules sentinelles et la libération de molécules vasodilatatrices et inflammatoires. Ainsi, les mastocytes vont sécréter des agents inflammatoires et de l'histamine qui est vasodilatateur (Ferstl, 2012), les macrophages et les DC vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  pour Tumor Necrosis Factor-alpha, IL-1 pour Interleukine-1, IL-6) et des chimiokines (IL-5, CXCL-10 pour C-X-C motif chimiokine ligand 10) (Arango Duque and Descoteaux, 2014). La libération de cytokines pro-inflammatoires va permettre le recrutement sur le site d'infection et l'activation des cellules monocytes/macrophages et/ou des neutrophiles dont la fonction va être de neutraliser le pathogène par phagocytose ou cytotoxicité. A noter que la vasodilatation a pour fonction de faciliter la diapédèse des cellules à travers la paroi des vaisseaux sanguins. (Figure 1).

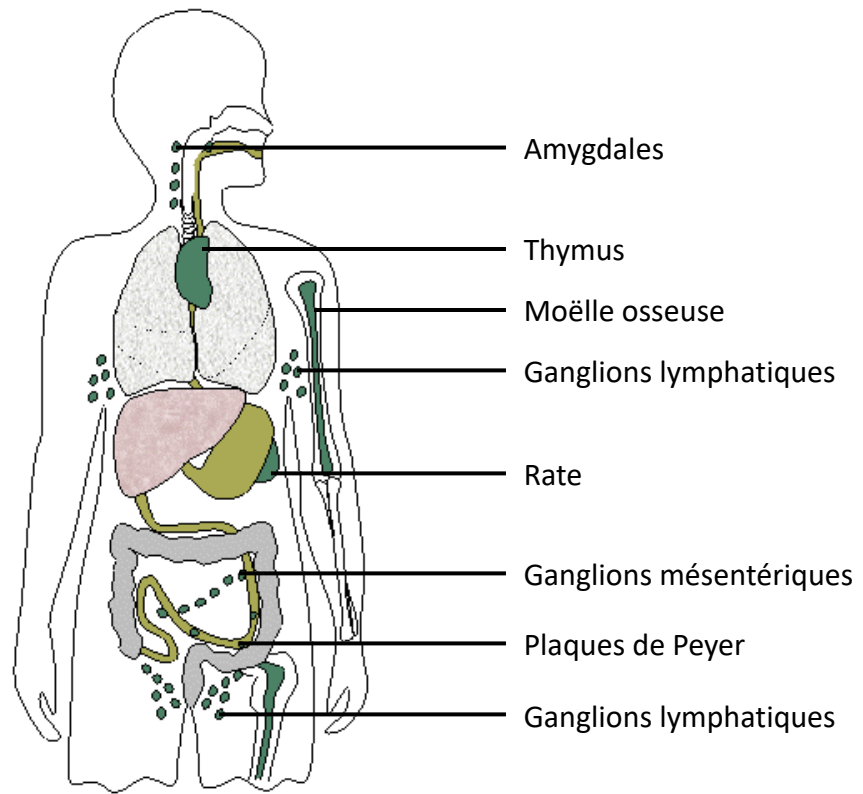
Si le pathogène est neutralisé, la réponse immunitaire s'arrête, sinon la réponse adaptative se met en place via l'activation des cellules spécifiques de l'immunité adaptative par les CPA.

## **1.3. L'immunité adaptative**

### **1.3.1. Généralités**

L'immunité adaptative est spécifique d'un pathogène donné et se met en place lors de l'échec de la destruction du pathogène par l'immunité innée. Dans le cas de l'immunité adaptative deux types de réponses sont possibles : la réponse immunitaire cellulaire faisant intervenir les lymphocytes T (LT) et la réponse humorale qui fait intervenir les lymphocytes B (LB).

A l'inverse de l'immunité innée qui reconnaît un ensemble de motifs moléculaires présents à la surface des pathogènes mais qui est limitée par la grande variabilité des structures antigéniques, l'immunité adaptative



**Figure 2 : Localisation des organes lymphoïdes primaires et secondaires dans l'organisme humain.**

Les organes lymphoïdes primaires sont le thymus et la moëlle osseuse des os longs (fémurs et humérus). Ce sont respectivement les lieux de développement des LT et des LB. Les organes lymphoïdes secondaires sont les amygdales, les ganglions lymphatiques, la rate, les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer. Ils constituent des lieux de rencontre entre Ag et lymphocytes présents dans ces lieux. La rate filtre le sang tandis que les ganglions lymphatiques filtrent de la lymphe.

repose sur la reconnaissance spécifique d'un antigène via des récepteurs spécifiques (Bonilla and Oettgen, 2010; Cooper and Alder, 2006). Du fait de la grande spécificité de reconnaissance, contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative est plus longue à se mettre en place (en général, elle nécessite plusieurs jours). Cette immunité se déroule principalement dans les lieux favorisant la rencontre avec les Ag qui sont les organes lymphoïdes secondaires comme la rate ou les ganglions lymphatiques (Figure 2).

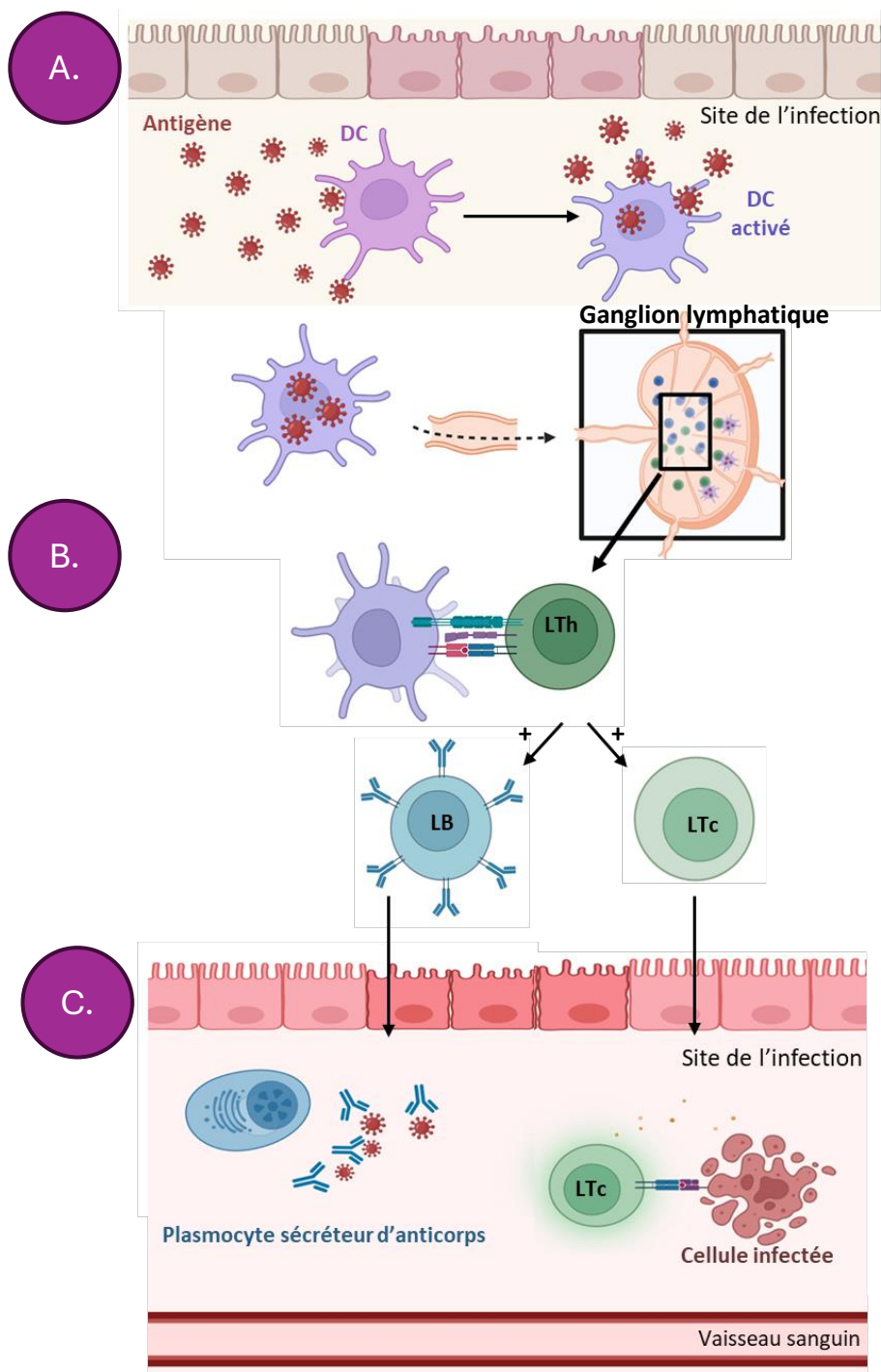
### **1.3.2. Lymphocytes et réponse immunitaire adaptative**

#### **1.3.2.1. Les lymphocytes T**

Les LT se développent dans le thymus, un organe lymphoïde primaire (Figure 2), et possèdent à leur surface un récepteur spécifique à l'antigène, le TCR (T Cell Receptor). Les LT matures deviennent actifs après présentation antigénique des CPA à leur TCR. Le mécanisme d'activation étant le même pour tous les LT, il y a malgré tout une grande diversité de fonctions effectrices en réponse à leur activation. En effet, deux grands types de LT se distinguent : les LT auxiliaires ou helper (LTh) et les LT cytotoxiques (LTc). Comme leurs noms l'indiquent, les LTh vont aider à la mise en place de la réponse immunitaire et l'orchestrer, et les LTc vont éliminer les cellules infectées par un pathogène ou les cellules cancéreuses.

Les LTh expriment à leur surface le cluster de différenciation CD4. Il existe trois types principaux de LTh : les Th1, Th2 et les Th17 (Bonilla and Oettgen, 2010; Saravia et al., 2019) caractérisés par les cytokines qu'ils produisent. Les Th1 se caractérisent par la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Interféron-gamma). Ils sont impliqués dans les infections intracellulaires bactériennes ou virales et dans l'activation des LTc et NK pour l'élimination des cellules cancéreuses. Les Th2 sécrètent les cytokines IL-4, IL-5, et IL-13 et sont importants pour les réponses contre les pathogènes extracellulaires type parasites, ils régulent la production d'anticorps (Ac) et activent aussi les LB. Les Th17 sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription (FdT) ROR $\gamma$  (He et al., 2017; Saravia et al., 2019) et par leur sécrétion d'IL-17A, IL-17F et IL-22, indispensables dans les infections fongiques et bactériennes (intracellulaires et extracellulaires) (Patel and Kuchroo, 2015). Ces trois types de Th sont indispensables au bon déroulement de la réponse immunitaire, sont antagonistes l'un de l'autre et sont dominants selon le type de pathogène rencontré (Zielinski, 2023).

Les LT régulateurs (Treg) se distinguent comme un autre type de Th chargé de réguler la réponse immunitaire et sont caractérisés par la libération d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) ainsi que par l'expression du FdT FOXP3 (Corthay, 2009). En effet, ils modulent l'activité des LTh pour éviter toute activité délétère pour l'organisme. Un autre type de Th à noter est le Th folliculaire qui favorise l'immunité humorale dans les organes lymphoïdes secondaires. Ce type de T se caractérise par la production d'IL-21, essentiel à la stimulation des LB (Chtanova et al., 2004).



**Figure 3 : Déroulement de la réponse immunitaire adaptative.**

Lors de l'activation du système immunitaire adaptatif, les cellules présentatrices d'antigènes (Ag) comme les cellules dendritiques (DC) rejoignent la circulation sanguine pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires (un ganglion lymphatique ici) (A). Les DC vont présenter des peptides antigéniques (liées à une molécule de CMH II) aux lymphocytes T helper (LTh) pour les activer. Les LTh activés vont à leur tour activer les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T cytotoxiques (LTc) qui par la suite rejoindront le site de l'infection par la circulation sanguine (B). Au contact de l'Ag, les LB se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Ac). Les Ac reconnaissent les Ag et forment un complexe immunitaire qui sera reconnu et éliminé par les cellules phagocytaires. Les LTc activés vont reconnaître les cellules infectées par un Ag ou qui présentent un CMH I altéré et vont les lyser grâce à leur pouvoir cytotoxique (C).

Les LTc, de leur côté, expriment à leur surface le cluster de différenciation CD8 et éliminent les cellules infectées ou cancéreuses via la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  et peuvent libérer également le contenu de leurs granules (perforine et granzymes) induisant l'apoptose des cellules dangereuses (Andersen et al., 2006).

Une des caractéristiques de l'immunité adaptative est la mémoire immunitaire. En effet, une fois le pathogène rencontré une première fois, des LT mémoires sont produits et une rencontre ultérieure avec le même pathogène entraîne la mise en place d'une réponse plus rapide et plus efficace. Ils ont aussi un taux de renouvellement plus important et sont plus spécifiques de l'antigène que des LT naïfs. Lors d'une seconde rencontre avec le même pathogène, les LT mémoires s'activent et produisent une quantité importante de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines favorisant l'activation et le recrutement des cellules du SI. Deux types de LT mémoires se distinguent : les cellules T mémoire centrales (TCM) et les cellules T mémoires effectrices (TEM). Ces cellules se distinguent par l'expression en surface de CCR47 présent sur les TCM et absent sur les TEM. Toutes deux sont retrouvées dans la rate, le sang et les ganglions lymphatiques (Künzli and Masopust, 2023). Les TCM soutiennent plus longtemps la réponse immunitaire et activent les TEM qui possèdent une activité cytolytique et combattent plus rapidement les pathogènes. Il existe aussi des cellules T mémoires résidentes du tissu retrouvées au niveau de la peau, du foie et des poumons par exemple (Kumar et al., 2018; Künzli and Masopust, 2023).

### 1.3.2.2. Les lymphocytes B

Les LB se développent dans la moëlle osseuse (MO) des os longs (Figure 2) chez l'Homme (fémurs et humérus) et la souris (fémurs et tibias). De façon similaire aux LT, les LB possèdent des récepteurs spécifiques à un Ag donné, correspondant à une immunoglobuline (Ig) membranaire (Eibel et al., 2014). La reconnaissance de l'Ag par le LB ne nécessite pas de présentation antigénique, le LB est capable de reconnaître un Ag sous sa forme native. Les Ig sont soit sous la forme membranaire : c'est le BCR (B Cell Receptor), soit sous la forme sécrétée : c'est l'Ac après reconnaissance avec l'Ag et différenciation du LB en plasmocyte sécréteur d'Ac. Les Ac sécrétés vont neutraliser le pathogène avant son élimination. Ils sont principalement retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires (i.e. rate, ganglions par exemple). Deux types de LB matures existent : les lymphocytes B-1 et les B-2.

Les lymphocytes B-1 se divisent en deux sous-groupes chez la souris : les B-1a caractérisés par l'expression de CD5 et les B-1b qui n'expriment pas CD5 à leur surface (Kantor et al., 1992; Stall et al., 1992). Ces cellules sont principalement trouvées dans les cavités pleurales et péritonéales et en moindre quantité dans les ganglions lymphatiques et la rate (Hardy and Hayakawa, 2015; Hayakawa et al., 1983). Elles produisent



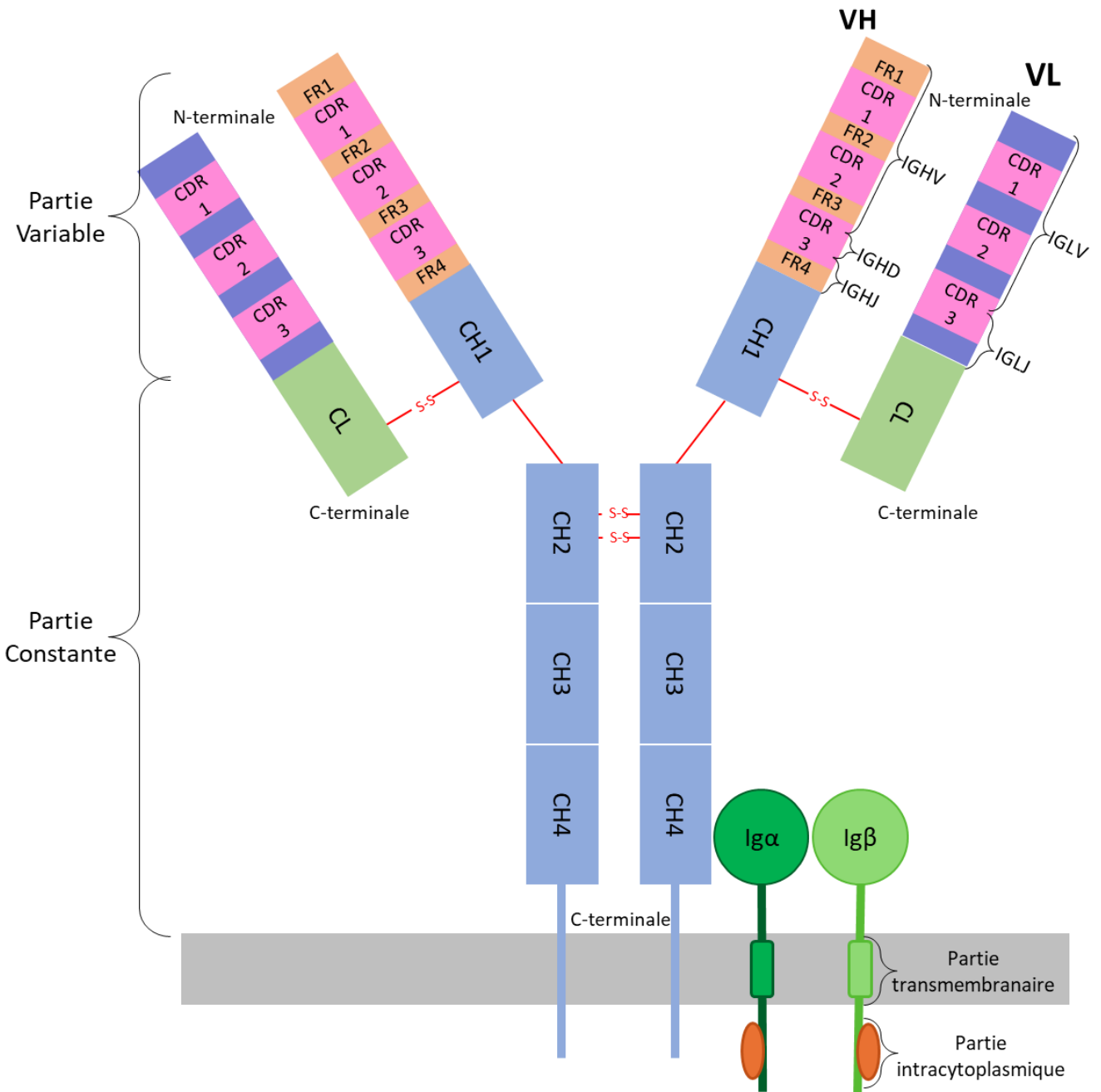
naturellement des anticorps de faible affinité : IgM à 80%, IgA et IgG3 sans stimulation antigénique préalable (Coutinho et al., 1995; Kaminski and Stavnezer, 2006; Panda et al., 2013). Il semble que ces cellules soient essentielles dans les étapes précoces des réponses antivirales et bactériennes mais peuvent aussi sécréter des cytokines et présenter des antigènes aux LT (Novaes E Brito et al., 2019; Smith and Baumgarth, 2019). Il semblerait cependant que les B-1 murins et humains soient différents. En effet, le marqueur CD5 ne permet pas de les définir et est retrouvé sur tous les types de LB humains (immatures à mémoires) (Lee et al., 2009; Sims et al., 2005). La population la plus similaire aux LB-1 murins se trouve dans le sang périphérique et dans le cordon ombilical mais il reste des différences comme la production d'anticorps qui contient des hypermutations somatiques (Griffin et al., 2011; Rothstein and Quach, 2015).

Les lymphocytes B-2 sont considérés comme les lymphocytes conventionnels, retrouvés principalement dans la rate et les ganglions lymphatiques. Ils se distinguent en deux types portant le nom de la zone où ils se trouvent : les LB folliculaires de la zone folliculaire (LB Fo) et les LB de la zone marginale (LB ZM) (Martin and Kearney, 2002; Rothenberg, 2016). Les LB Fo nécessitent l'aide des LTh pour s'activer et vont se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Ac) de haute affinité reconnaissant essentiellement des Ag dits thymo-dépendants. Leur activation provoque la formation d'un centre germinatif. Les centres germinatifs permettent aux LB de se multiplier, d'augmenter la spécificité et l'affinité de leur BCR pour l'Ag et de changer les fonctions effectrices de l'Ac via les mécanismes d'hypermutations somatiques (mutations dans les domaines variables pour augmenter l'affinité BCR-Ag, voir 2.4) et de commutations de classes (changements de l'isotype du BCR, voir 2.4) (Allman and Pillai, 2008; Zhang et al., 2016). Les LB ZM peuvent répondre à des Ag thymo-dépendants ou thymo-indépendants et se différencient rapidement en plasmocytes qui sécrètent en général des Ac de faible affinité. Etant donnée la localisation et la rapidité de s réponses mises en place par les LB ZM, cette population constitue une première voie d'activation rapide de l'immunité adaptative (Zouali and Richard, 2011).

Finalement, les LB ayant la plus forte affinité pour l'Ag vont devenir des LB mémoires qui persistent dans le temps (Akkaya et al., 2020). Ils permettent une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace en cas d'une nouvelle rencontre avec le pathogène (Akkaya et al., 2020; Bonilla and Oettgen, 2010).

### **1.3.2.3. Déroulement de la réponse immunitaire adaptative**

Comme décrit précédemment, les différents lymphocytes interagissent de manière différente avec l'Ag. Les LB reconnaissent directement l'Ag via leur BCR alors que les LT nécessitent une présentation antigénique par une CPA via le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) (Bonilla and Oettgen, 2010; LeBien and Tedder, 2008). Il y a les CPA dites « non professionnelles » englobant l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme



**Figure 4 : Représentation schématique de la structure du récepteur à l'antigène des lymphocytes B (BCR) de type IgM.**

Le BCR est formé par deux chaînes lourdes H (heavy) et deux chaînes légères L (Light) reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne se compose d'une partie constante (CH et CL) d'1 à 4 domaines (1 domaine CL pour la chaîne légère, 4 domaines CH pour les isotypes M et E et 3 pour les isotypes A, G et D) et d'une partie variable (VH et VL). Les parties variables se composent de régions charpentes nommées 'Framework' (FR) et de 'Complementary Determining Region' (CDR) qui concentrent la diversité de séquence. Ces parties sont formées de segments V et J pour la chaîne légère et de segments V, D et J pour la chaîne lourde. Le BCR est associé à un complexe de transduction du signal composé de chaînes Igα et Igβ contenant une partie transmembranaire et une partie intracytoplasmique contenant les motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs).

(hors cellules germinales) qui vont présenter aux LT des peptides antigéniques endogènes via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et les CPA « professionnelles », comprenant notamment les DC, les macrophages et les LB. Ces cellules vont présenter des peptides antigéniques exogènes aux LTh via les molécules du CMH de classe II (Bonilla and Oettgen, 2010; Savina and Amigorena, 2007).

Lors de l'échec de l'immunité innée, pour activer la réponse adaptative, les CPA comme les DC vont rejoindre la circulation sanguine et atteindre les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter des peptides antigéniques aux LTh et les activer (Figure 3A et 3B). Les LTh activés vont orchestrer la réponse immunitaire en activant les LB et les LTc qui vont rejoindre le site de l'infection (Figure 3B).

Au contact de l'Ag, les LB se différencient en plasmocytes sécréteurs d'Ac. Les Ac vont reconnaître et former un complexe immun avec l'Ag qui est ensuite reconnu puis éliminé par les cellules phagocytaires. Les LTc, quant à eux, vont exercer leur pouvoir cytotoxique spécifiquement sur les cellules infectées ou cancéreuses en reconnaissant des molécules du CMHI altérées ou présentant des peptides dérivés de pathogènes intracellulaires.

La reconnaissance antigénique par les récepteurs lymphocytaires va donc engendrer l'activation, la prolifération et la maturation de LT et LB qui vont venir en aide aux cellules du SI inné. A la suite de la neutralisation de l'Ag, une mémoire immunitaire se met en place et correspond à un répertoire de LT et LB ayant une forte spécificité et une forte affinité pour un Ag donné (Figure 3C). La mémoire immunitaire entraîne une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace si rencontre ultérieure avec ce même antigène (Akkaya et al., 2020; Kumar et al., 2018; Opata and Stephens, 2013).

Dans la suite du manuscrit nous nous intéresserons plus spécifiquement au LB.

## **2. LYMPHOCYTE B**

Les LB font partie de l'immunité adaptative et sont les acteurs principaux de la réponse humorale notamment grâce à leur récepteur à l'Ag appelé BCR ou immunoglobuline (Ig).

### **2.1. Le BCR, récepteur à l'antigène**

Les immunoglobulines peuvent être soit présentes en surface des LB, on parle alors de BCR, soit sécrétées on parle alors d'anticorps. Cependant, quel que soit leur expression, la structure est la même.



Activité fonctionnelle	IgD	IgE	IgM	IgA	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Neutralisation	---	---	+	++	++	++	++	++
Opsonisation	---	---	+	+	+++	---	++	+
Activation de l'activité cytotoxique des NK	---	---	---	---	++	---	++	---
Activation des mastocytes	---	+++	---	---	+	---	+	---
Activation du système du complément	---	---	+++	+	++	+	+++	---

**Tableau 2 : Résumé des fonctions effectrices des différents isotypes d'anticorps.**

Le signe - indique que l'anticorps ne possède pas une fonction tandis que le signe + indique que l'anticorps possède la fonction effectrice. Le nombre de + indique les fonctions principales.

Source : Janeway's Immunology, 8ed. (© Garland Science 2012)

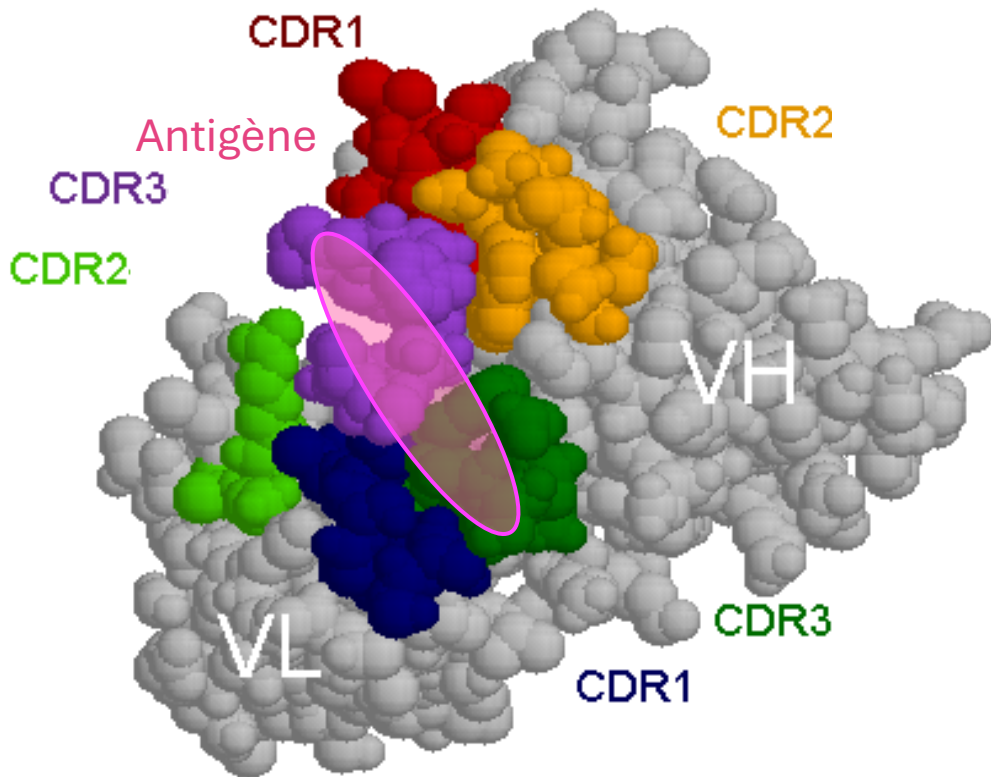
### 2.1.1. Structure du BCR

Une Ig est une glycoprotéine se composant d'un hétérotétramère constitué des deux chaînes légères L (Light) identiques et deux chaînes lourdes H (Heavy) identiques. Les chaînes lourdes se composent de 3 ou 4 domaines constants nommés CH1 à CH4 à l'extrémité C-terminale (3 CH pour IgG, IgD et IgA et 4 CH pour IgM et IgE) ainsi que d'un domaine variable VH. Les chaînes légères L se composent d'un domaine constant CL et d'un domaine VL. Les domaines VL et VH correspondent au site de liaison à l'Ag, c'est le paratope. Des ponts disulfures lient chaînes légères et lourdes entre-elles ainsi que les chaînes lourdes entre-elles (Figure 4).

Les domaines variables, en N-terminale sont composés d'une alternance de régions charpentes ou Framework (Fr) 1 à 4 qui maintiennent sa structure, et de boucles hypervariables ou Complementary Determining Region (CDR) 1 à 3. Parmi les 3 régions CDR, CDR3 est la plus longue (16 acides aminés en moyenne contre 8 acides aminés pour les régions CDR1 et CDR2), la plus variable et contribue de façon majeure au site de liaison à l'antigène (Figure 5). Cependant, c'est l'ensemble de ces trois boucles qui va porter la variabilité et ainsi permettre la reconnaissance spécifique d'un Ag. Il est important de noter que chaque LB possède une Ig qui lui est propre. De plus, les deux chaînes H et L étant identiques, une Ig possède deux paratopes identiques capables de lier le même antigène.

La reconnaissance d'un antigène entraîne l'activation du LB. Cependant, le BCR seul ne peut pas transmettre de signal d'activation, il doit être associé à un dimère de signalisation  $Ig\alpha-Ig\beta$  (CD79A-CD79B) par une liaison non-covalente avec la partie extracellulaire du BCR (Minegishi et al., 1999). Ces deux chaînes sont constituées d'une partie extracellulaire avec deux domaines immunoglobuline-like reliés par un pont disulfure, d'une partie transmembranaire et d'une partie intracytoplasmique possédant des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) (Figure 4). La reconnaissance de l'Ag par le BCR va induire la phosphorylation des tyrosines situées au niveau des motifs ITAM, importante pour le déroulement de réponses immunitaires normales (Gazumyan et al., 2006; Hou et al., 2006; Saijo et al., 2003). En effet, les ITAM phosphorylés vont activer de nombreuses voies de signalisation permettant la maturation du LB naïf, sa survie, sa prolifération mais aussi sa différenciation en plasmocyte sécréteur d'Ac ou LB mémoire (Tkachenko et al., 2023).

### 2.1.2. Les classes d'immunoglobulines



**Figure 5 : Exemple de structure 3D du site de liaison à l'antigène d'une immunoglobuline.**

Les domaines variables de la chaîne lourde (VH) et de la chaîne légère (VL) forment le site de liaison à l'antigène et constitue le paratope d'une immunoglobuline. Chaque domaine variable est composé de trois boucles hypervariables ou Complementary Determining Region: CDR 1 à 3. Les boucles CDR3s contribuent de façon majeure au site de liaison à l'antigène puisqu'elles sont les plus longues et les plus variables. C'est d'ailleurs elles qui sont en contact direct avec l'antigène. (source : modifiée d'après <http://imgt.org/>)

Comme nous l'avons vu il existe plusieurs types de chaînes lourdes, qui vont définir les isotypes d'Ig. Chez l'Homme, il existe 5 isotypes d'Ig : IgM, IgG, IgD, IgE et IgA qui se définissent par le type de chaîne lourde H : epsilon pour les IgE, mu pour les IgM, delta pour les IgD, alpha pour les IgA et gamma pour les IgG. Parmi ces isotypes, il existe 2 sous-classes d'IgA (IgA<sub>1</sub> et IgA<sub>2</sub>) ainsi que 4 sous-classes d'IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> et IgG<sub>4</sub>). Il existe aussi deux types de chaînes légères : kappa et lambda.

Chaque isotype a des fonctions effectrices bien précises qui sont présentées dans le Tableau 2. Parmi les fonctions effectrices des Ac, l'opsonisation consiste au recouvrement d'une cellule infectée ou d'un pathogène cible par des anticorps afin de créer un complexe immun qui sera détruit. La neutralisation qualifie un Ac qui reconnaît et cible un pathogène et neutralise ses effets biologiques en s'y fixant. Les Ac activent aussi les mastocytes via la formation d'un complexe Ac-Ag. La fixation du complexe Ag-Ac sur un récepteur du mastocyte qui reconnaît la partie constante de l'Ac, induit une libération de médiateurs chimiques (comme l'histamine) et provoque des réactions physiologiques (vomissements, éternuements par exemple) permettant d'excréter l'agent pathogène hors de l'organisme. L'activation du pouvoir cytotoxique des NK est aussi une fonction des Ac puisqu'une cellule NK possède des récepteurs reconnaissant la partie constante d'un Ac et la fixation d'un complexe Ac-cellule infectée active le pouvoir cytotoxique du NK et engendre la dégradation de la cellule infectée. Enfin, les Ac ont aussi pour fonction d'activer le système du complément qui permet l'élimination des Ag.

## 2.2. Recombinaison V(D)J

### 2.2.1. Aspects génétiques

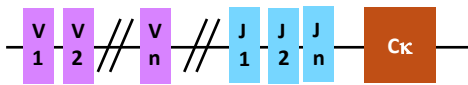
Le mécanisme de recombinaison V(D)J est intimement lié à la structure des loci codant les chaînes d'immunoglobulines. A l'état natif ces loci ne sont pas fonctionnels, ils sont composés de plusieurs segments géniques potentiellement codants séparés par des régions non codantes. Le locus IGH est composé de plusieurs segments V pour Variable, D pour Diversité, J pour Jonction et C pour Constant. Les loci IGK et IGL ne possèdent pas de segments D (Figure 6). Les segments V, D et J vont coder la région variable des chaînes d'Ig et les segments C les régions constantes. Le nombre des segments V, D et J varie entre les différents types de chaînes et entre espèces (Tableau 3 et 4).

Pour obtenir des loci fonctionnels, un réarrangement somatique doit avoir lieu au niveau des segments V, D (pour IGH) et J, c'est le mécanisme de recombinaison V(D)J. Le mécanisme général est présenté dans la Figure 7D. Dans le cas du locus IGH, un segment J va s'associer à un segment D (Etape 1, figure 7D) puis cette association D-J va s'associer avec un segment V (Etape 2, figure 7D). Dans le cas des loci IGK et IGL, seule l'association V-J a lieu. L'association des différents segments conduit à la formation de la boucle CDR3 qui est

## IGH



## IGK



## IGL



**Figure 6 : Présentation schématique de l'organisation des loci IGH, IGK et IGL chez l'Homme.**

Les loci IGH, IGK et IGL sont organisés différemment. À l'état non réarrangé, les loci contiennent plusieurs segments V (Variable), D (Diversité), J (Jonction) et C (Constant). Les segments D ne se trouvent que dans le locus IGH. (source : d'après <http://imgt.org/>)

impliquée dans la reconnaissance de l'Ag. Cette boucle est formée par l'association de l'extrémité 3' d'un segment V, du segment D (dans le cas d'une chaîne lourde) et l'extrémité 5' d'un segment J. L'association des segments se fait de façon plus ou moins aléatoire et peut théoriquement générer jusqu'à  $10^{12}$ - $10^{15}$  combinaisons possibles chez l'Homme (Schroeder, 2006).

### 2.1.3 Choix des segments V, D et J

Ces différents segments V, D et J, qu'ils appartiennent aux chaînes lourdes ou chaînes légères, sont classés en différentes familles selon leur homologie de séquences (Tableau 5). Théoriquement, les associations pourraient être faites aléatoirement entre les différents segments géniques. Dans ce cas, la probabilité d'apparition de toutes les associations serait équivalente, or un biais d'utilisation a été observé. La plupart des associations VDJ observées chez l'Homme contiennent des V des familles IGHV3 et IGHV4 (Hong et al., 2018; Martin et al., 2015), des D de la famille IGHD3 pour 60% des BCR de LB matures ou de la famille IGHD2 pour 14%. Concernant les J, ce sont les segments des familles IGJ4 à IGJ6 qui sont les plus représentés avec 57% de segments J4, 12% de J5 et de J6 pour les BCR de LB matures humains (Raaphorst et al., 1997). Nous pouvons supposer que certains segments seraient plus utilisés car ils appartiennent à des familles possédant un grand nombre de segments, ils seraient donc plus utilisés car leur nombre favoriserait leur utilisation, ou bien que ces segments conféreraient un avantage et produirait des Ig plus efficaces contre les Ag. Il est aussi à noter que les répertoires BCR varient en fonction de l'âge et du sexe (Gong et al., 2021; Martin et al., 2015; Webster et al., 2022). Ces biais dans le choix des segments sont peut-être la résultante de différents facteurs telle que le remodelage de la chromatine ou les facteurs épigénétiques qui auraient un impact sur les segments choisis (Chi et al., 2020). Ceux-ci seront discutés dans la partie 2. 2. 3.

### 2.2.2. Mécanismes moléculaires de la recombinaison V(D)J

Le mécanisme de recombinaison peut se diviser en 2 grandes étapes : clivage de l'ADN et réparation de l'ADN.

#### 2.2.2.1. Première étape : clivage de l'ADN

##### 2.2.2.1.1. RSS et règle 12/23

La 1<sup>ère</sup> étape du processus comprend une coupure de l'ADN réalisée par les protéines RAG1 et RAG2 (Recombination-Activating Gene 1 & 2) à la jonction entre les segments codants et les séquences signales de recombinaison (RSS pour Recombination Signal Sequence). Les RSS sont constitués d'un heptamère très conservé de séquence consensus 5'-CACAGTG-3', d'un espaceur de 12 ou 23 nucléotides (ici, c'est sa longueur qui importe, pas sa séquence) ainsi que d'un nonamère de séquence consensus 5'-ACAAAACC-3'

	Chromosomes	
	Homme	Souris
IGH	14	12
IGK	2	6
IGL	22	16

**Tableau 3 : Localisations chromosomiques des segments géniques codant pour les chaînes lourdes et légères du BCR chez l'Homme et la souris.**

La localisation chromosomique des segments géniques codant le BCR varie en fonction des espèces.

IGH : chaîne lourde ; IGK : chaîne légère kappa ; IGL : chaîne légère lambda.

Source : <http://imgt.org/>

(Carmona and Schatz, 2017; Xu et al., 2012). De façon intéressante, l'heptamère est essentiel à la reconnaissance de la séquence par le complexe RAG1-RAG2 dont les 3 premiers nucléotides sont hautement conservés et critiques pour que la recombinaison soit effectuée.

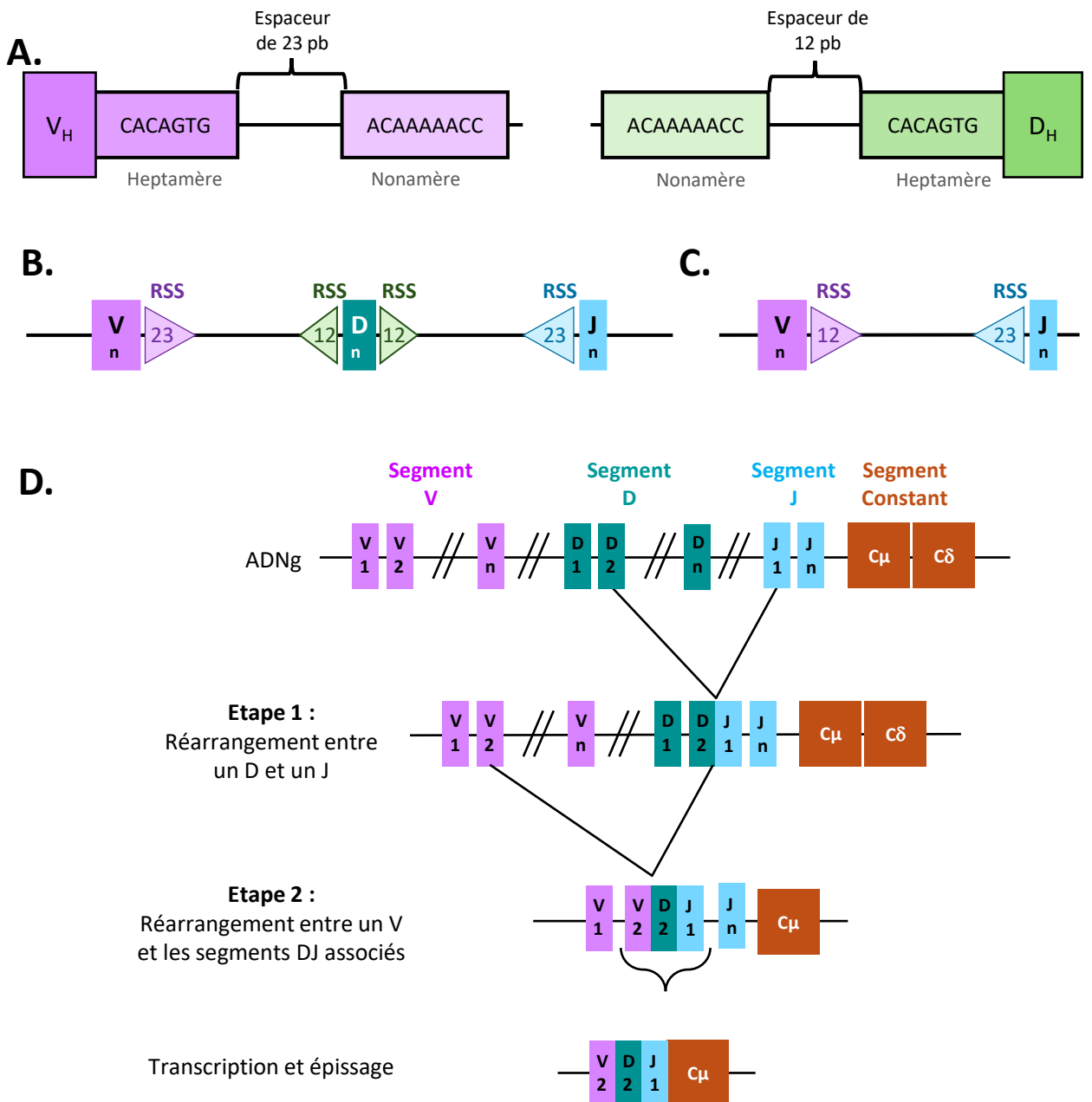
Concernant la chaîne lourde, les RSS sont retrouvés à l'extrémité 3' des IGHV et 5' des IGHJ portant tous deux des espaceurs de 23 pb tandis que le segment IGHD est flanqué par des RSS ayant des espaceurs 12 pb (Figure 7A & 7B) ; c'est la règle 12-23 (Tonegawa, 1983). Cette règle permet une recombinaison efficace seulement si les RSS s'associant ont des espaceurs différents. Ainsi, un segment IGHD peut interagir avec un segment IGHJ et un segment IGHV alors qu'un segment IGHV ne peut interagir avec un segment IGHJ. Concernant la chaîne légère, l'extrémité 3' du segment V et l'extrémité du 5' du segment J contiennent respectivement des espaceurs de 12 et 23 pb, ce qui permet une association VJ (Figure 7C).

De façon intéressante, il a été montré que la règle 12/23 de la recombinaison V(D)J n'est pas toujours respectée en condition physiologique résultant en des associations aberrantes et hybrides comme un réarrangement VDDJ. Ce type de réarrangement hybride apparaît dans le locus IGH environ 1 fois toutes les 800 cellules (Parkinson et al., 2015).

#### **2.2.2.1.2. Complexe RAG1/2 et clivage de l'ADN**

Le clivage de l'ADN est réalisé par le complexe RAG1/2 (Recombination-Activating Genes 1 & 2) dont l'activité est imprécise résultant en la délétion de quelques nucléotides (Ru et al., 2015). Dans ce complexe, l'activité catalytique, et les interactions avec l'heptamère et le nonamère sont principalement portées par RAG1 (Kim et al., 2015). RAG2 semblerait activer RAG1, permettre la stabilisation du complexe RAG1-RAG2 et augmenter la fixation spécifique à l'ADN (Rodgers, 2017; Roth, 2014; Ru et al., 2015). Les séquences RSS sont reconnues par RAG1 qui vont rapprocher les segments cibles, les protéines RAG1/2 vont former un complexe avec les protéines HGMB1 ou HGMB2 (High Mobility Group) (Figure 8). Ces dernières permettent une meilleure fixation des protéines RAG sur les RSS. Selon la règle du 12/23, la fixation du complexe RAG sur un RSS va aboutir à l'hybridation d'un RSS ayant un espaceur de 23 pb avec un RSS ayant un espaceur de 12 pb. En effet, des études structurelles ont montré que les protéines RAG sont en forme de Y dans lesquelles les sites actifs de RAG1 attachent les RSS avec les deux types d'espaceurs permettant de placer les deux RSS dans la même phase et permettre une recombinaison entre les deux (Ciubotaru et al., 2015; Grundy et al., 2009; Kim et al., 2015; Ru et al., 2015) et donc éviter une recombinaison entre 2 mêmes segments.

Par la suite, une coupure simple brin est introduite à la jonction entre les segments codant et le RSS via le complexe RAG1/2 aboutissant à la formation d'une extrémité 3'OH libre qui va attaquer le brin d'ADN opposé



**Figure 7 : Représentations schématiques des séquences signales de recombinaison (RSS) et des associations des V, D et J lors de la recombinaison V(D)J.**

Les RSS sont constitués de séquences conservées de 7 (heptamère) et 9 (nonamère) nucléotides séparés par des séquences nucléotidiques, nommées espaceur, non conservées pour la séquence mais pour le nombre de nucléotide (**A**). Dans le locus IGH, les séquences RSS sont localisées en 3' des segments IGHV, 5' des segments IGHJ et de part et d'autre des segments IGHD. Pour les segments IGHV et IGHJ, l'espaceur est de 23 nucléotides et pour les segments IGHD, il est de 12 nucléotides (**B**). Pour les chaînes légères, les séquences RSS sont localisées en 3' des segments IGLV et 5' des segments IGLJ avec un espaceur de 12 nucléotides pour le segment V et un espaceur de 23 nucléotides pour le segment J (**C**). Lors de la recombinaison V(D)J, dans le cas de la chaîne lourde, il y a association plus ou moins aléatoire d'un D et d'un J suivie de l'association d'un V avec le DJ préalablement formé. Par la suite l'association VDJ est transcrite et épissée donnant dans ce cas une immunoglobuline de type M (**D**).

par une réaction de transestérification. Cette réaction va aboutir à la formation de structures en épingle à cheveux aux extrémités des segments géniques et à des bouts francs aux extrémités des séquences non codantes flanquées par les RSS qui formeront une boucle d'excision qui sera perdue (Figure 8).

### **2.2.2.2. Deuxième étape : Réparations de l'ADN**

Suite de l'action du complexe RAG1/2, il y aura résolution de la boucle en épingle à cheveux suivie de l'intervention du système de réparation de l'ADN NHEJ (Non-Homologous End Joining). Le système de réparation NHEJ est le système de réparation majeur de l'ADN. Deux voies de ce système existent et sont impliquées dans la recombinaison V(D)J : la voie classique (C-NHEJ) qui est la voie majeure et la voie alternative (Alt-NHEJ) qui est plus rarement impliquée.

#### **2.2.2.2.1. Voie canonique dans la recombinaison V(D)J et finalisation de la réparation**

La voie C-NHEJ fait intervenir plusieurs protéines telles que l'hétérodimère Ku70/Ku80, les DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase), l'endonucléase Artémis, la ligase ADN IV (Lig IV), les ADN polymérases  $\mu$  (pol  $\mu$ ) and  $\lambda$  (pol  $\lambda$ ), XRCC4 (X-ray Cross Complementing Group 4) et XLF (XRCC4-like factor) (Maezawa et al., 2016; Malu et al., 2012). L'hétérodimère Ku70/Ku80 se fixe en premier aux cassures de l'ADN (Chang et al., 2017) ce qui va les protéger de la digestion par les nucléases. Le complexe Ku70/Ku80-ADN va ensuite permettre le recrutement de deux DNA-PKcs à chaque extrémité de la cassure, l'ensemble forme le complexe DNA-PK. Le complexe DNA-PK recrute aussi l'endonucléase Artémis (Figure 9) (Chang and Lieber, 2016). Les DNA-PKcs s'autophosphorylent et activent Artémis.

Artémis, grâce à son activité d'endonucléase en 5' et 3', va ouvrir la structure en épingle à cheveux. Cette activité endonucléase étant plus ou moins précise, des séquences palindromiques (P-diversité) peuvent être créées, ce qui va conduire à l'ajout de nucléotides au niveau des jonctions V-D et D-J pour les chaînes lourdes et de la jonction V-J pour les chaînes légères (Figure 9) (Jeggo and O'Neill, 2002; Ma et al., 2002).

Après coupure des épingles à cheveux par Artémis, une ADN polymérase intervient, c'est la TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) (Wang, 2020). La TdT ajoute des nt non-génomiques (N-diversité) aux jonctions entre les segments V-J et V-D-J. Cet ajout de nt augmente la diversité (Figure 9).

Par la suite, les extrémités simples brins ainsi remaniées aux extrémités des segments codants impliqués dans le processus de recombinaison vont s'hybrider sur quelques nucléotides, les parties simples brins

**A.**

	IGH							
	IGHV		IGHD		IGHJ		IGHC	
	Total	F	Total	F	Total	F	Total	F
<b>Homme</b>	123-129	38-46	27	23	9	6	11	9
<b>Souris</b>	152	97	17-20	14	4	4	8-9	8-9

**B.**

	IGL					
	IGLV		IGLJ		IGLC	
	Total	F	Total	F	Total	F
<b>Homme</b>	73-74	29-33	7-11	4-4	7-11	4-5
<b>Souris</b>	8	8	5	3	4	2-3

**C.**

	IGK					
	IGKV		IGKJ		IGKC	
	Total	F	Total	F	Total	F
<b>Homme</b>	76	31-35	5	5	1	1
<b>Souris</b>	174	94-96	5	4	1	1

**Tableau 4 : Nombre de segments géniques totaux et fonctionnels (F) dans les loci codant pour les chaînes lourdes et légères du BCR chez l'Homme et la souris.**

Le nombre de segments V, D, J et C codant pour le BCR varie en fonction des espèces et des loci IGH (A), IGL (B) et IGK (C).

V = Variable ; D = Diversité ; J = Jonction ; C (Constant) ; IGH : chaîne lourde ; IGK : chaîne légère kappa ; IGL : chaîne légère lambda.

Source : <http://imgt.org/>

flottantes seront éliminées, et les régions simples brins de l'ADN seront polymérisées par les ADN polymérases de la famille PolX, pol $\mu$  ou pol $\lambda$  ( $\mu$  pour la chaîne lourde et  $\lambda$  pour la chaîne légère) recrutées par les protéines Ku (Figure 9) (Pryor et al., 2015).

Il y aura ensuite phosphorylation de XRCC4 par les DNA-PKcs ce qui permet le recrutement d'un complexe de ligation composé de LigIV, XRCC4 and XLF ayant pour fonction de finaliser le réarrangement en liant les segments codants entre eux : V-D-J pour les chaînes lourdes et V-J pour les chaînes légères (Figure 9) (De Ioannes et al., 2012; Malu et al., 2012).

Le segment C, qui code pour la partie constante des Ac, n'est pas associé lors de la recombinaison V(D)J. Il est associé aux segments géniques réarrangés par épissage. Les deux premiers gènes C transcrits sont C $\mu$  dans la majorité des cas et C $\delta$  (Figure 10) via un épissage alternatif et est donc plus rare. Les premiers isotypes exprimés sont donc IgM en majorité et IgD (Geisberger et al., 2006). Les autres isotypes sont exprimés après une rencontre avec l'Ag suite à la commutation de classe (CSR) (Chi et al., 2020).

#### **2.2.2.2. Voie alternative dans la recombinaison V(D)J**

La voie Alt-NHEJ a d'abord été vue comme un système de secours dans la réparation des cassures double brin d'ADN (DSB) (Truong et al., 2014; Yan et al., 2007), désormais il semblerait qu'elle intervienne aussi dans les cellules dont la voie C-NHEJ est intacte. Cependant, cette voie reste très rare car les protéines Ku, actrices de la C-NHEJ, ont plus d'affinité pour les DSB que les protéines PARP1 (Polymerase ADP Ribose A) de la voie Alt-NHEJ. De façon très brève, les PARP1 reconnaissent les DSB et s'y lient afin de recruter le complexe protéique MRN composé de Mre11 (Meiotic recombination 11), Rad50 (ATP-binding cassette ATPase) et enfin de Nbs1 (phosphopeptide-binding Nijmegen breakage syndrome protein 1) puis CtIP (carboxy-terminal binding - interacting protein) (Wei and Yu, 2016). Ce complexe va initier la résection de l'ADN en brins flottants d'ADN simples brins. Cela va exposer la micro-homologie interne des sites de cassures ce qui pourrait faciliter l'hybridation spontanée des brins flottants d'ADN simple brin et il n'y aurait donc pas de réparation. Cependant, la fixation de RPA (Replication protein A) sur les brins flottants d'ADN simple brins empêche les hybridations spontanées pour permettre le bon déroulement de la voie Alt-NHEJ. Par la suite, l'ADN polymérase Pol $\theta$ -helicase va dissocier RPA de l'ADN et étendre les brins flottants et le complexe Ligase ADN I ou III avec le complexe XRCC1 permet de réparer la cassure (Deng et al., 2014; Wei and Yu, 2016).

#### **2.2.2.3. Diversité de jonction**

**A.**

	IGH		
	IGHV	IGHD	IGHJ
Homme	7 (IGHV1 à V7)	7 (IGHD1 à D7)	6 (IGHJ1 à 6)
Souris	16 (IGHV1 à V16)	6 (IGHD1 à D6)	4 (IGHJ1 à 4)

**B.**

	IGK	
	IGKV	IGKJ
Homme	7 (IGKV1 à V7)	5 (IGKJ1 à J5)
Souris	20 (IGHV1 à V20)	5 (IGKJ1 à J6)

**C.**

	IGL	
	IGLV	IGLJ
Homme	11 (IGLV1 à V11)	7 (IGLJ1 à J115)
Souris	3 (IGLV1 à V3)	4 (IGLJ1 à J4)

**Tableau 5 : Répartition par famille des segments V, D et J codant les chaînes lourdes et légères du BCR chez l'Homme et la souris.**

La répartition en familles des segments V, D et J codant pour le BCR varie en fonction des espèces et des loci IGH (A), IGK (B) et IGL (C).

V = Variable ; D = Diversité ; J = Jonction ; IGH: chaîne lourde ; IGK: chaîne légère kappa ; IGL: chaîne légère lambda.

Source : <http://imgt.org/>

Comme nous l'avons vu, différentes enzymes interviennent dans la recombinaison V(D)J dont certaines, par leurs activités vont contribuer à augmenter la diversité des BCR au niveau de la jonction V(D)J. Ainsi, l'activité imprécise de RAG1-RAG2 peut provoquer une délétion de nt au niveau des extrémités 3'V, 5'D, 3'D et 5'J. L'activité d'Artémis peut conduire à la création de séquences palindromiques à partir de la séquence germinale des segments en 3'V, 5'D, 3'D et 5'J. Enfin, la Tdt par son action va accroître la diversité en ajoutant des nucléotides non génomiques. Ces trois actions peuvent conduire à des décalages du cadre de lecture et augmentent la diversité (Figure 11). Finalement, la diversité du répertoire BCR est générée à deux niveaux : le nombre important de réarrangements possibles entre tous les segments (V, D, J) mais aussi l'activité des enzymes spécifiques de la recombinaison V(D)J (RAG1, RAG2, Artémis et TdT). Dans 2/3 des cas, ces ajouts ou délétions décalent le cadre de lecture pouvant amener à l'apparition d'un codon stop prématuré ou modifier la séquence en aa des régions constantes et donc aboutir à des synthèses de chaînes non fonctionnelles (Malu et al., 2012).

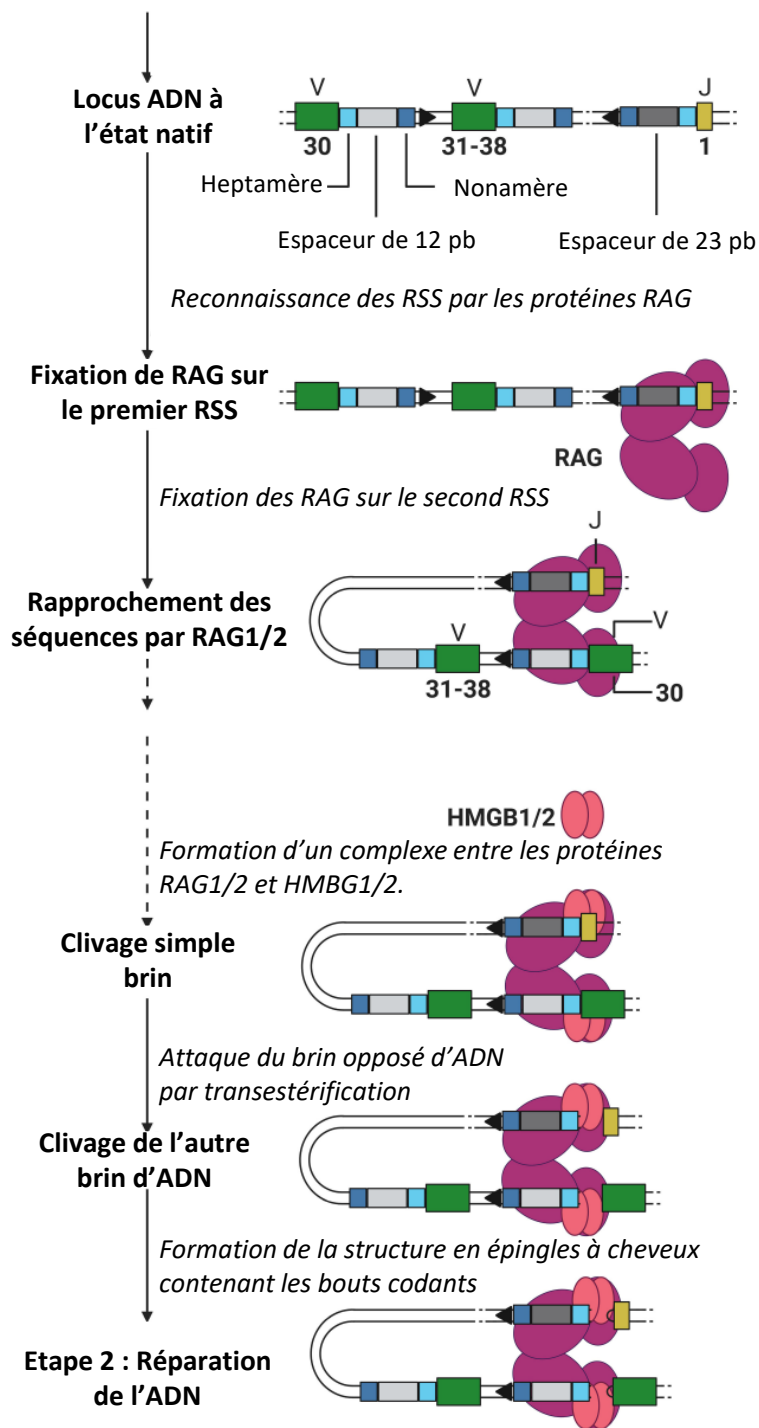
### 2.2.3. Régulations moléculaires de la recombinaison V(D)J

La recombinaison V(D)J n'est pas un mécanisme infaillible malgré le fait qu'il soit essentiel à la réponse immunitaire adaptative et à la diversité du répertoire BCR. Des défauts de ce mécanisme sont à l'origine de nombreuses maladies et lymphomes (Bassing et al., 2002). Par exemple, des mutations des protéines RAG et Artémis entraînent un déficit immunitaire combiné sévère (Dalal and Tasher, 2012; Mombaerts et al., 1992; Moshous et al., 2001; Shinkai et al., 1992). Il existe donc différents niveaux de régulations de la recombinaison V(D)J afin d'éviter au maximum les erreurs.

#### 2.2.3.1. Les séquences RSS

Le 1<sup>er</sup> niveau de régulation est permis par la règle 12/23 (Tonegawa, 1983) ou seuls deux segments avec des RSS aux espaceurs différents peuvent recombiner. Des réarrangements aberrants sont possibles notamment si des mutations apparaissent au niveau des espaceurs et/ou des RSS. Etant donné l'importance de la conservation des séquences nucléotidiques des RSS pour les protéines RAG, ce genre de mutation va fortement altérer l'interaction RAG-ADN (Olaru, 2004). Cette importance de conservation des séquences nucléotidiques des RSS n'est pourtant pas absolue dans la recombinaison V(D)J, c'est le cas des RSS cryptiques.

Les RSS cryptiques sont des séquences d'ADN proches des RSS qui sont erronées souvent de quelques nucléotides seulement et qui peuvent porter les 3 premiers nucléotides de l'heptamère indispensables à RAG pour les reconnaître. Ces RSS cryptiques sont souvent associées à des oncogènes ou à des gènes suppresseurs



**Figure 8 : Etape 1 de la recombinaison V(D)J : clivage de l'ADN, exemple de la chaîne légère.**

L'étape 1 de la recombinaison V(D)J correspond au clivage de l'ADN et fait intervenir les séquences signal de recombinaison RSS (Recombinaison Signal Sequence) situées en 3' des segments V et en 5' des segments J dans le cas d'une chaîne légère. Les protéines RAG1 et RAG2 forment un complexe avec les protéines HMBG1/2. Ce complexe effectue un clivage simple brin de l'ADN entre la séquence codante des segments à réarranger et l'heptamère. Cette coupure engendre la formation d'une extrémité 3'OH libre qui participe à la réaction de transestérification sur le brin opposé et forme ainsi des structures en épingle à cheveux aux extrémités contenant les segments codants. Les bouts francs flanqués des RSS sont circularisés pour former une boucle d'excision qui sera perdue. L'étape de 2 consistera en la réparation de l'ADN. (source : modifiée d'après Braams et al., 2023)

de tumeurs et sont reconnus par les protéines RAG1/2, provoquant une recombinaison illégitime responsable de certains lymphomes (Papaemmanuil et al., 2014; Roth, 2014).

De façon intéressante, une étude récente a montré que les protéines RAG seraient capables de reconnaître les RSS cryptiques en dehors et dans les sites d'Ig provoquant une boucle d'excision avec les RSS cryptiques (de façon très similaire à ce qui se passe pendant la recombinaison V(D)J) mais au lieu d'être dégradée, cette boucle d'excision contenant les RSS cryptiques seraient insérées dans le cadre de lecture de réarrangements corrects d'Ig augmentant encore la diversité des BCR (Koning et al., 2020).

### **2.2.3.2. Régulations des protéines RAG**

Les protéines RAG sont des facteurs essentiels initiant la recombinaison V(D)J. Pour permettre le bon déroulement de celle-ci, il existe trois niveaux de régulation des protéines RAG : une régulation transcriptionnelle, une régulation de l'activité du complexe et une régulation de sa dégradation.

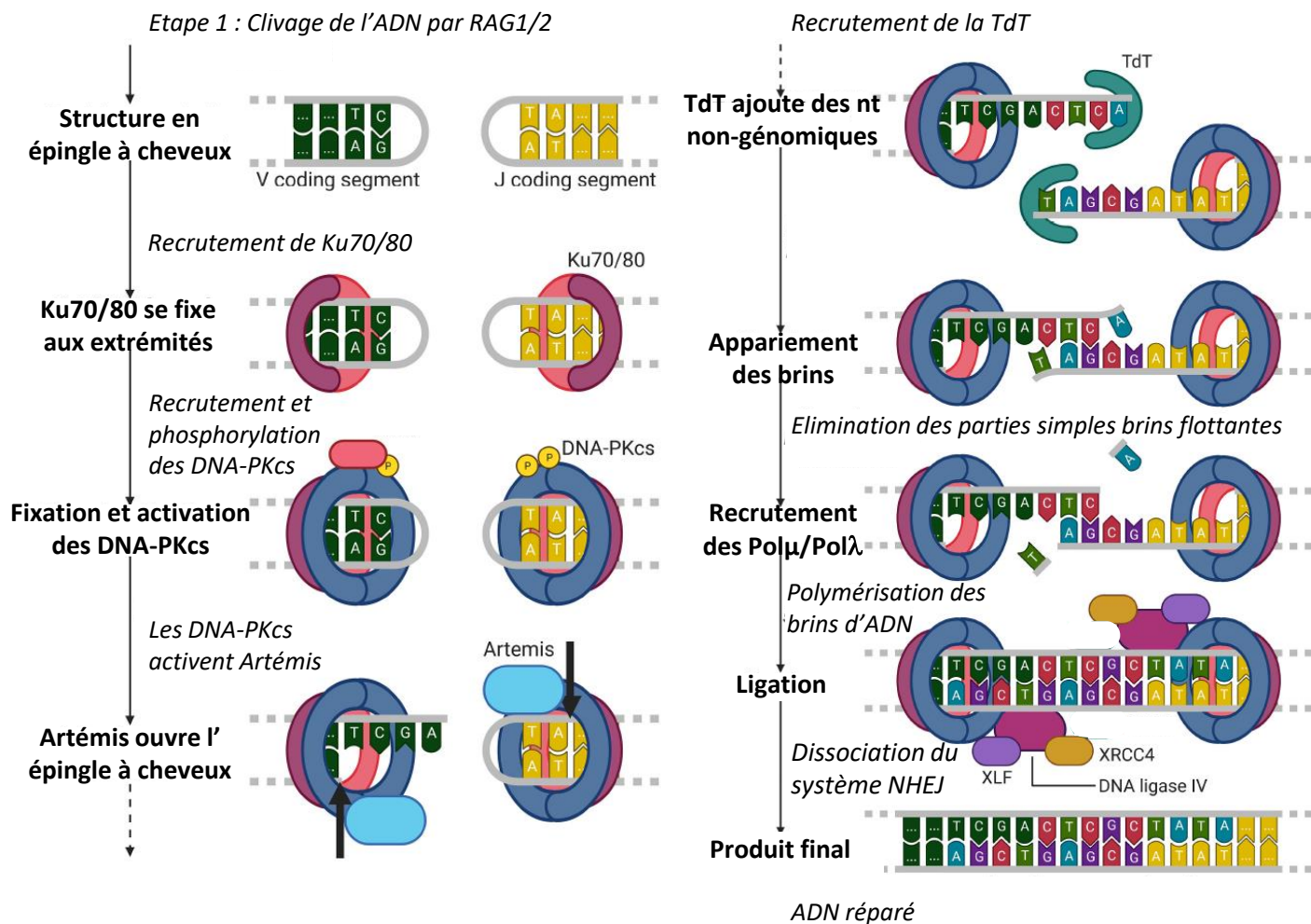
#### **2.2.3.2.1. Régulation transcriptionnelle**

Un des niveaux de régulation s'effectue au niveau transcriptionnel. Les protéines RAG sont finement régulées et exprimées de façon différentielle au cours du développement lymphocytaire. Le taux de transcription de ces protéines est élevé pendant le réarrangement des chaînes lourdes et légères mais diminue lorsque la recombinaison est terminée (Nagaoka et al., 2000).

La protéine FOXO a d'ailleurs été montrée comme activatrice de la transcription de RAG1/2 et permet d'augmenter la quantité de RAG pour initier la recombinaison V(D)J (Herzog et al., 2009; Timblin and Schlissel, 2013). De plus, le FdT Ebf1 régule directement le promoteur de RAG1/2 et permet leur expression lors du développement des LB (Timblin and Schlissel, 2013).

#### **2.2.3.2.2. Régulation de l'activité**

La régulation fine de l'activité des protéines RAG constitue un autre moyen de réguler la recombinaison V(D)J. Les protéines RAG sont capables de s'autoréguler via la partie N-terminale de RAG1 qui possède une activité ubiquitine ligase E3 (Yurchenko et al., 2003). Il semblerait que RAG1 est capable d'auto ubiquitiner sa partie N-terminale ce qui augmenterait l'activité de clivage des RAG (Beilinson et al., 2021; Singh and Gellert, 2015). La partie C-terminale de RAG2, quant à elle, est capable d'inhiber l'activité de RAG1 (Teng and Schatz, 2015) permettant un autre niveau d'autorégulation.



**Figure 9 : Etape 2 de la recombinaison V(D)J : réparation de l'ADN, exemple de la chaîne légère.**

Suite au clivage par les protéines RAG1/2, le système de réparation NHEJ est recruté. Les protéines Ku70 et Ku80 (rose/violet) sont recrutées sur les extrémités de l'ADN clivé. Ces protéines recrutent à leur tour les DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinases) à chaque extrémité de la cassure. Les DNA-PKcs sont phosphorylées ce qui permet leur activation et leur fixation sur l'ADN. Par la suite, elles recrutent et activent Artémis qui coupe les structures en épingles à cheveux et forme des séquences palindromiques libres. Ensuite, l'ADN polymérase TdT (Terminal Déoxynucléotidyl Transférase) intervient et catalyse l'addition aléatoire de nucléotides (nt) non-génomiques aux extrémités 3' libres des segments. Le système NHEJ recrute ensuite des polymérases de la famille des Pol X (polμ et polλ) pour polymériser les régions simples brins. La DNA Ligase composée des enzymes ligase IV, XRCC4 et XLF termine le réarrangement. (source : modifiée d'après Braams et al., 2023)

### 2.2.3.2.3. Régulation de la dégradation

Un autre niveau de régulation est le contrôle de la dégradation des protéines RAG. Les protéines RAG sont exprimées de façon différentielle pendant le cycle cellulaire pour permettre à la recombinaison V(D)J de se dérouler au bon moment. La protéine RAG2 est exprimée seulement pendant la phase G0/G1 du cycle cellulaire et recrute RAG1 pour la recombinaison. Ces protéines diminuent ensuite fortement, environ 5 à 20 fois, lors de l'entrée en phase S comparé à la phase de quiescence G0 (Lin and Desiderio, 1994). La recombinaison V(D)J a donc lieu en phase G0/G1 du cycle cellulaire. De façon intéressante, RAG2 est régulée par dégradation dépendante de l'ubiquitylation (Mizuta et al., 2002). En effet, lors du passage en phase S, RAG2 est phosphorylée sur sa Thr406 par le complexe protéique cycline A1/Cdk2 (cyclin dépendant kinase 2) induisant sa relocalisation dans le cytoplasme. La phosphorylation de la Thr406 crée un site de liaison pour un complexe d'ubiquitination (complexe SCF) permettant l'ubiquitination de RAG2 et sa dégradation (Jiang et al., 2005). Il y a donc une régulation fine des protéines RAG au cours du cycle cellulaire.

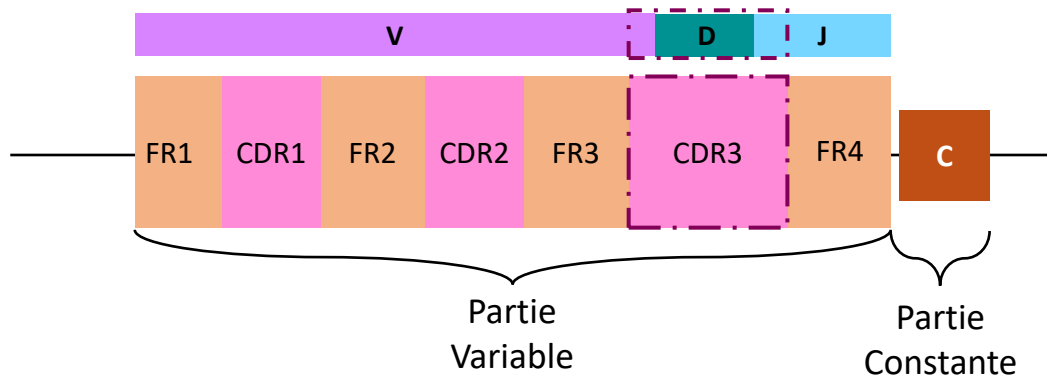
### 2.2.3.3. Régulations de la chromatine

La chromatine est définie comme le complexe ADN et toutes les protéines qui lui sont associées. Parmi ces protéines, les histones vont contribuer à la régulation de la compaction de l'ADN.

Le complexe histone se compose de 8 sous-unités protéiques correspondant à quatre protéines histones présentes chacune en deux exemplaires : H2A, H2B, H3 et H4. En plus de l'octamère d'histone, l'histone linker H1 va contribuer à stabiliser le complexe ADN + octamère d'histones (Füllgrabe et al., 2010; Henikoff, 2008), le tout formant le nucléosome. Les histones possèdent une structure centrale globulaire ainsi que des queues formées par les extrémités N et C terminales (Figure 12A). De nombreuses modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu sur ces queues (Shukla et al., 2008; Spivakov and Fisher, 2007) comme les acétylations, les méthylations, les phosphorylations et l'ubiquitination. Cet ensemble de modifications forme le code histone qui permet la régulation du degré de compaction de la chromatine ce qui va contribuer à la régulation transcriptionnelle et à rapprocher des séquences d'ADN éloignées.

#### 2.2.3.3.1. Rapprochement de séquences éloignées et formation de boucles

Comme nous l'avons vu dans la partie 2.1.2, les loci codant les chaînes d'Ig sont très étendus, la recombinaison V(D)J nécessite donc le rapprochement des séquences RSS associées aux segments qui vont s'associer. La restructuration de la chromatine est nécessaire afin de réaliser ce rapprochement. Ainsi, l'étude du locus IGH avant recombinaison a mis en avant une structure en forme de rosettes à multi-boucles dans



**Figure 10 : Transcrit du BCR obtenu après la recombinaison V(D)J, exemple de la chaîne lourde.**

À la fin de la recombinaison V(D)J de la chaîne lourde, il est obtenu un transcrit avec une partie variable et une partie constante. La partie variable se compose d'une succession de régions 'Framework' 1 à 4 (FR) et de 'Complementary Determining Region' (CDR) 1 à 3. Les 3 régions CDRs sont des régions hypervariables correspondant au site de liaison du BCR à l'antigène, notamment CDR3 qui contribue de façon majeure au site de liaison. Ces CDRs sont séparés par les régions FR qui sont des régions charpentes et permettent de maintenir la structure du BCR. La partie C (constante) détermine l'isotype du BCR.

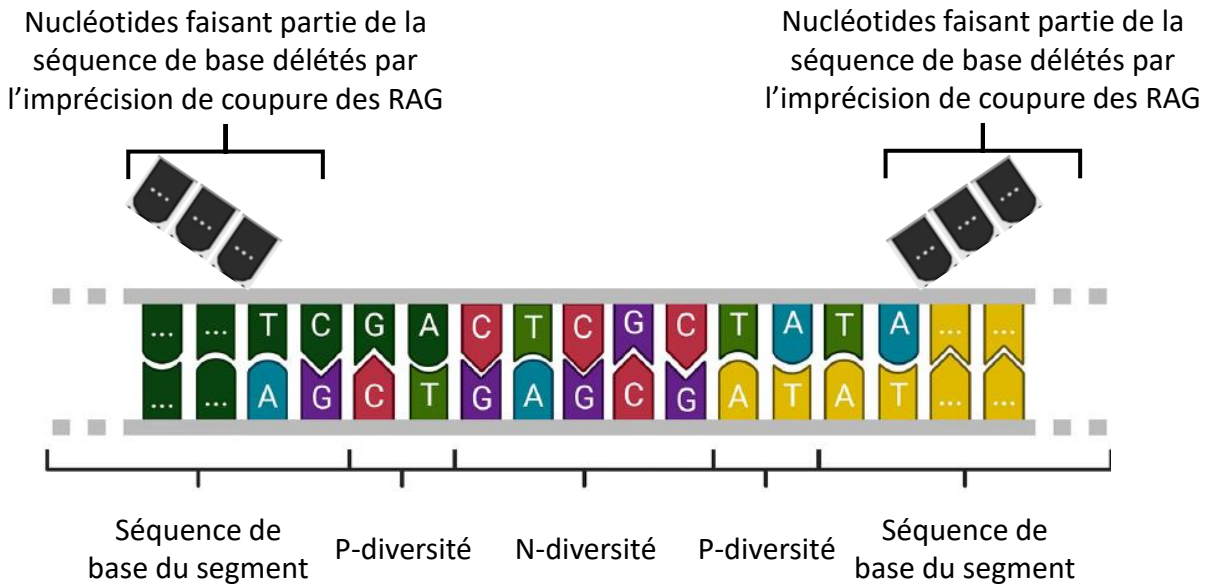
laquelle les segments D et J sont séparés des segments V (Figure 12B) (Bossen et al., 2012; Kumari and Sen, 2015). Un des processus pour réguler la formation de ces boucles est la contraction de la chromatine. Ainsi, lors du réarrangement entre le V et le DJ préalablement formé, la chromatine se contracte au niveau des V distaux et facilite l'assemblage V-DJ. Cela permet d'une part de rapprocher les éléments entre eux mais aussi d'avoir accès à plus de V, notamment les V distaux (Chi et al., 2020; Zhang et al., 2022). D'un point de vue pratique, la possibilité de rapprocher les V distaux pour les rendre accessibles permet d'avoir un pool plus important de segments V à disposition et de ce fait d'avoir un répertoire BCR plus divers (Chi et al., 2020; Zhang et al., 2022). De plus, cette contraction recrute les protéines RAG initiatrices du réarrangement. La formation des boucles fait intervenir notamment les protéines CTCF (CCCTC-binding Factor) et la cohésine. La protéine CTCF va reconnaître les séquences de motifs CCCTC et la cohésine va permettre d'associer deux CTCF proches, dont l'orientation est compatible et situées sur des sites différents de l'ADN. Le regroupement de deux CTCF associées chacune à des régions d'ADN différentes permet la contraction de la chromatine et de rapprocher ces régions (Zhang et al., 2022).

Pax5 semble également impliqué. En effet, des études ont montré que la délétion de Pax5 réduit le nombre d'associations VDJ impliquant des V distaux sans affecter l'utilisation des V proximaux, ce qui laisse supposer que la formation de boucles permettant le rapprochement des V distaux est affectée (Fuxa et al., 2004; Hesslein et al., 2003).

En conclusion, Pax5 semble impliqué dans la disponibilité des V distaux, alors que les CTCF pourraient être impliqués dans le réarrangement des V proximaux. Il semble donc qu'en fonction de la localisation des segments V, il y ait différents mécanismes pour réguler la recombinaison V(D)J et son efficacité (Bolland et al., 2016; Ma et al., 2024).

#### **2.2.3.3.2. Modifications post-traductionnelles des histones**

Les modifications post-traductionnelles des histones participent également à la régulation de la recombinaison V(D)J. En effet, il a été montré que les allèles en cours de recombinaison présentent une hyperacétylation des histones, modification associée à l'augmentation de l'accessibilité de la chromatine, et qui diminue très fortement après recombinaison (Boller et al., 2018). De plus, plusieurs études ont mis en évidence une répartition inégale de différentes modifications post-traductionnelles des histones (Choi et al., 2013; Xu and Feeney, 2009). Par exemple, l'analyse ChIPseq réalisée par Choi et collaborateurs en 2013 sur des cellules pro-B de souris C57BL6, a montré des répartitions différentes de modifications d'histones. De façon intéressante, les mono et di-méthylations de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me1 et H3K4me2) sont plus présentes sur les régions centrales et distales, la tri-méthylation de cette lysine (H3K4me3) semble moins



**Figure 11 : Représentation schématique de la diversité obtenue par recombinaison V(D)J.**

La diversité due à la recombinaison V(D)J est obtenue à plusieurs niveaux. Le premier niveau est obtenu par l'association plus ou moins aléatoire des différents segments V, D et J pour la chaîne lourde et V, J pour la chaîne légère. Le second niveau de diversité est obtenu grâce aux empreintes d'activité des enzymes spécifiques de la recombinaison V(D)J. RAG1/2 possède une activité de coupure imprécise et peut déléter les nucléotides de la séquence ADN de base. Artémis va ajouter des séquences palindromiques appelé P-diversité, la Terminal Déoxynucléotidyl Transférase ajoute des nucléotides non génomiques appelé N-diversité. (source : modifiée d'après Braams et al., 2023)

présente. Enfin, la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) est concentrée (mais à un faible niveau) sur la région proximale (Choi et al., 2013). Plus spécifiquement, la tri-méthylation de la lysine de l'histone H3 (H3K4me3) a été montrée comme essentielle à la recombinaison V(D)J. En effet, RAG2 va la reconnaître et interagir avec la chromatine ce qui va induire des changements de conformation du complexe RAG1/2 et stimuler l'interaction avec les RSS et le clivage de l'ADN (Bettridge et al., 2017). Ces marques ne sont donc pas distribuées de façon équivalente sur le locus IGH (Boller et al., 2018)

En conclusion, l'ensemble de ces études a mis en évidence l'importance des modifications post-traductionnelles des histones dans la recombinaison V(D)J.

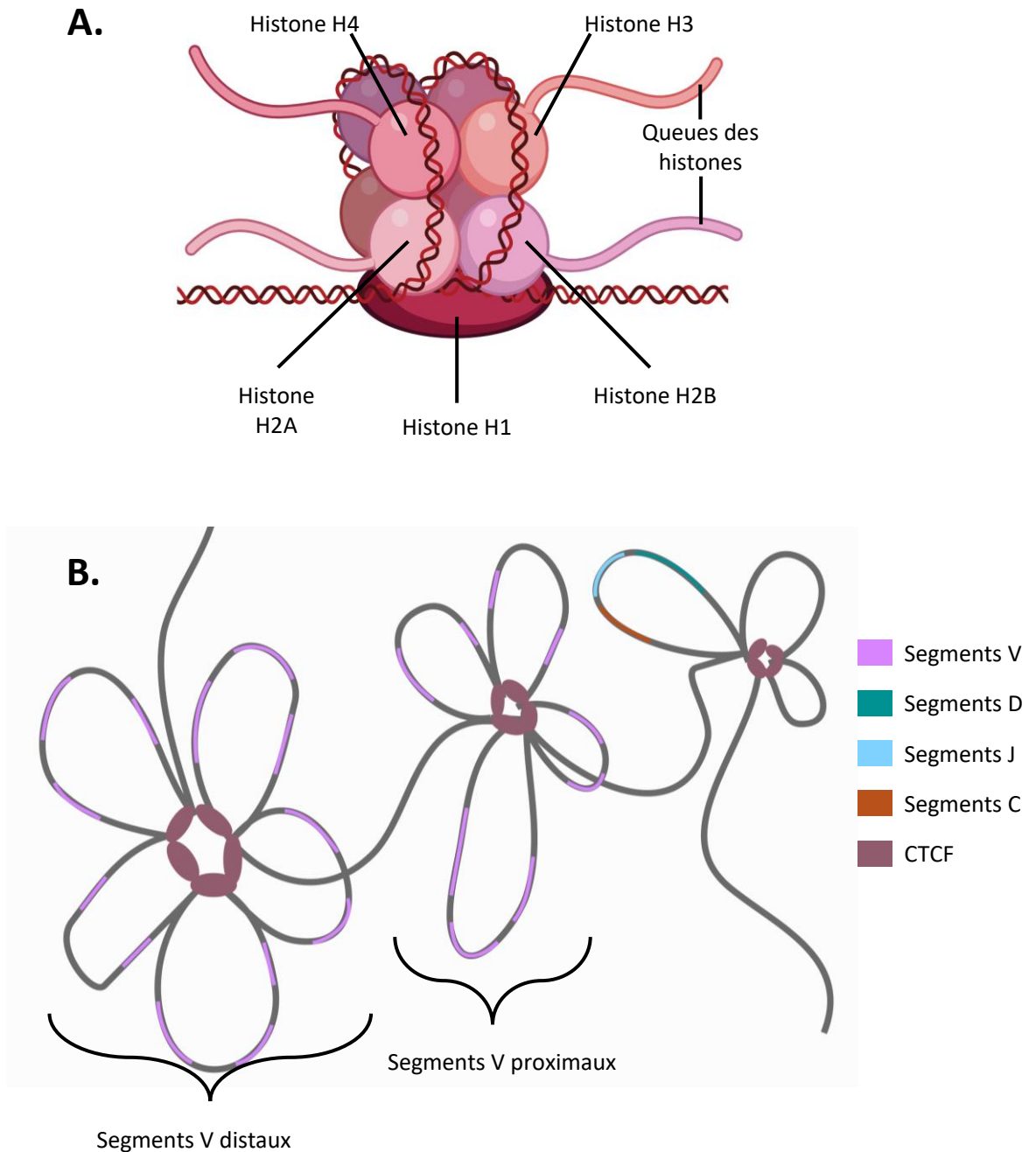
### **2.2.3.3. Relocalisation nucléaire**

Un autre facteur important pour réguler la recombinaison V(D)J est la localisation du locus IGH dans le noyau. Ce phénomène va contribuer à la régulation de l'accessibilité du locus et donc à son activation ou sa répression. Lors de la lymphopoïèse B, le locus IGH est ancré à la périphérie nucléaire via ses segments V distaux qui ne sont alors pas accessibles car placés dans un état répressif, tandis que les segments D et J sont libres. Ceci va faciliter le réarrangement D-J en début de recombinaison. Le locus IGH se relocalise ensuite en une position plus centrale annulant l'effet répressif jusque-là subit par les segments V. Cet éloignement de la périphérie nucléaire réactive les segments V et va contribuer à initier le réarrangement V-DJ (Powers et al., 2012; Skok et al., 2001). La relocalisation nucléaire régule donc la recombinaison V(D)J lors des réarrangements mais aussi lors de l'exclusion allélique comme nous allons le voir (Holwerda et al., 2013).

### **2.2.3.4. Exclusion allélique**

Un LB exprime à sa surface un seul type de BCR. Ce BCR, composé de chaînes lourdes et légères, est unique. Il y a donc expression d'un récepteur à l'Ag monoclonal. Le mécanisme d'exclusion allélique va permettre d'exprimer un seul des deux allèles et d'assurer l'expression d'un seul type de BCR en plusieurs exemplaires sur le LB (Schlissel, 2002). Ainsi, si un allèle est recombiné de manière fonctionnelle, le deuxième allèle ne doit pas subir la recombinaison V(D)J. Il est à noter que génétiquement parlant, l'allèle choisi n'est pas soumis à des empreintes parentales et donc le choix de l'allèle n'est pas régulé par l'origine des allèles.

Cette répression de recombinaison sur l'un ou l'autre allèle est permise notamment par la relocalisation nucléaire du locus. En effet, il a été montré que lorsque le premier allèle recombine, celui-ci se relocalise plus au centre du noyau pour permettre l'activation de la recombinaison et y reste provoquant la relocalisation de l'allèle 2 vers la zone péri-centrométrique, s'avérant être répressive ce qui inhibe la recombinaison V(D)J



**Figure 12 : Organisation du nucléosome et structure en rosette du locus IgH.**

Le nucléosome se compose de l'association de l'ADN avec les protéines histones. Les protéines histones s'organisent en 8 histones présentes en deux exemplaires : H2A, H2B, H3 et H4. L'ensemble ADN/histones est stabilisé par l'histone linker H1. Les queues N et C terminales des histones peuvent porter des modifications post-traductionnelles ayant un effet sur l'état de la chromatine (**A**). Le locus IGH se structure en forme de rosettes avec plusieurs boucles distinctes avant la recombinaison V(D)J, ces structures sont dynamiques et pourront se rapprocher pour permettre le réarrangement des divers segments. Ces boucles se forment grâce à l'action des protéines CTCF qui rapprochent des morceaux de chromatine (**B**).

de cet allèle. Si la recombinaison de l'allèle 1 ne donne pas un produit fonctionnel, l'allèle 2 se relocalise au centre du noyau, conditions propices au réarrangement tandis que l'allèle 1 se retrouve dans la zone répressive en périphérie (Ebert et al., 2015; Roldán et al., 2005; Skok et al., 2001). Cette relocalisation dans le noyau permettrait donc de s'assurer qu'un seul allèle est recombiné et exprimé et donc un seul BCR.

En plus de la régulation de la localisation, la dérégulation de RAG2 après l'obtention d'une chaîne lourde recombinaison et l'absence des protéines RAG sur l'autre allèle permettent d'empêcher la recombinaison du second allèle (Corcoran, 2005).

### **2.2.3.5. Régulation de la recombinaison du locus IGK**

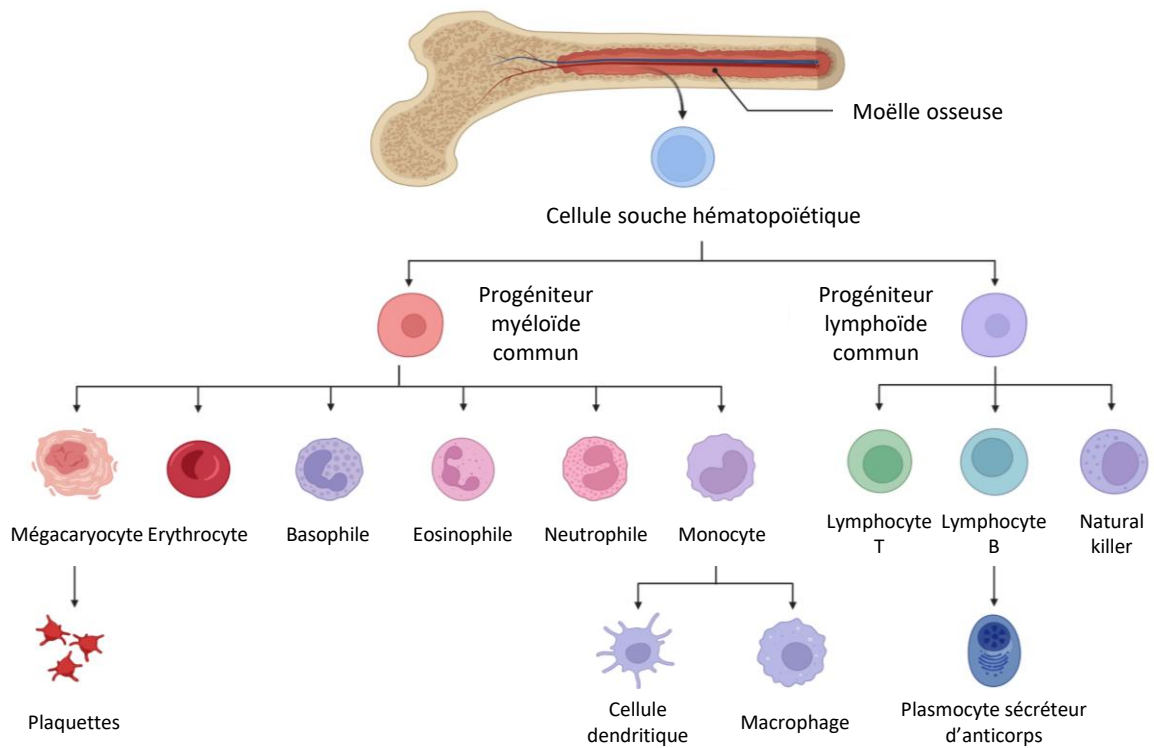
Il est important de mentionner que la régulation de la recombinaison du locus IGK est différente. En effet, les RSS des V $\kappa$  sont de qualités différentes et peuvent être évalués selon un score nommé « RSS Information Content scores ». De façon théorique, plus le score qualité d'un V est élevé, plus la probabilité de recombinaison de ce V est élevée. De plus, la méthylation d'H3K4 et la fixation d'IKAROS au niveau des RSS sont essentielles à la bonne recombinaison du locus IGK et participent à l'augmentation de la fréquence de recombinaison. Enfin, la fixation de certains FdT sur les enhancers du locus IGK (iEk et 3'Ek) est cruciale puisque cette fixation va permettre d'activer la recombinaison de ce locus, c'est par exemple le rôle du FdT PU.1 qui se fixe sur les RSS de V $\kappa$  (Dahl et al., 2018; Kleiman et al., 2018; Matheson et al., 2017).

## **2.3. Lymphopoïèse B**

### **2.3.1. Généralités**

La lymphopoïèse B correspond au développement d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) en cellule progénitrice lymphoïde pour donner une cellule B mature naïve. Le développement du LB se déroule dans un organe lymphoïde primaire : le foie fœtal chez l'embryon puis la moëlle osseuse (MO) chez l'adulte (Figure 2). Lors de la lymphopoïèse B, le LB acquiert de nombreuses fonctions et spécificités dont son BCR. Une fois cette maturation effectuée, les LB migreront vers les organes lymphoïdes secondaires par la circulation sanguine (Wang, 2020).

La MO est le lieu où se déroule l'hématopoïèse qui correspond au développement de toutes les cellules sanguines de l'organisme. Elle produit des CSH qui se différencient en deux types de progéniteurs : les progéniteurs myéloïdes et les progéniteurs lymphoïdes (Figure 13). Les progéniteurs myéloïdes sont à l'origine des érythrocytes, neutrophiles, basophiles, macrophages, plaquettes etc, alors que les progéniteurs lymphoïdes sont à l'origine des NK, des précurseurs des LT (maturant par la suite dans le thymus) et des LB



**Figure 13 : Aperçu général des différenciations possibles d'une cellule souche hématopoïétique.**

À partir de la moëlle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques peuvent donner naissance à tous les types de cellules sanguines par deux lignées différentes : la lignée myéloïde (progéniteur myéloïde commun) et la lignée lymphoïde (progéniteur lymphoïde commun). La lignée myéloïde comprend les mégacaryocytes (qui donneront naissance aux plaquettes), érythrocytes, granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), et les monocytes (voire cellule dendritique ou macrophage). La lignée lymphoïde donne quant à elle, des lymphocytes T, lymphocytes B (voire plasmocyte) ou des natural killer.

(Source : Jacob et al., 2023)

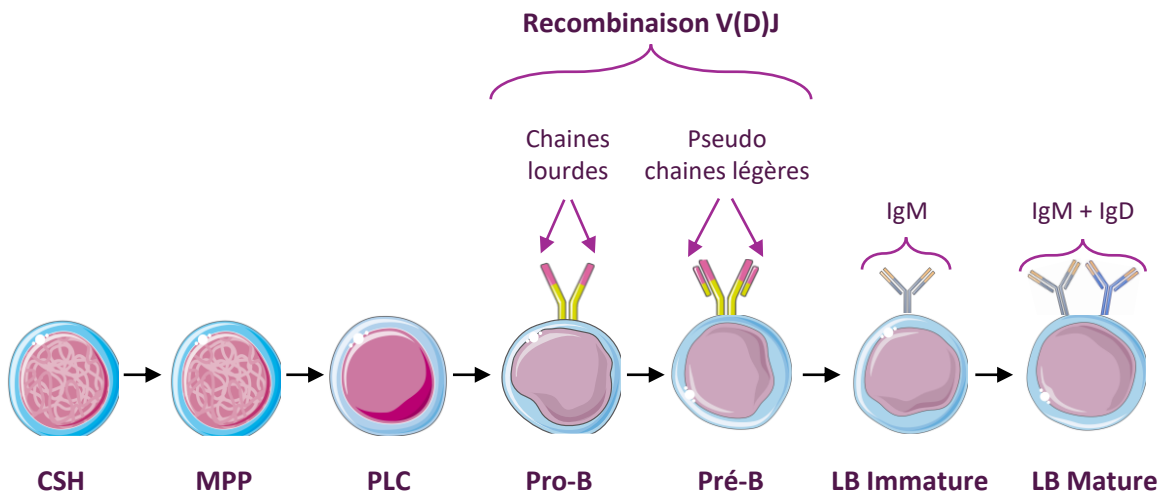
(Figure 13). La MO est composée d'un microenvironnement médullaire avec de multiples cellules comme des adipocytes, des ostéoblastes, des ostéoclastes et des cellules endothéliales organisées en forme de niches hématopoïétiques. C'est dans ces niches que va se dérouler la maturation et la régulation des différentes cellules et notamment des LB (Isern and Méndez-Ferrer, 2011). En effet, les cellules stromales des niches synthétisent des facteurs de croissance et des cytokines essentiels au développement des CSH.

### 2.3.2. Stades de développement

Le développement des LB démarre avec les CSH qui subissent une division asymétrique donnant naissance aux cellules progénitrices multipotentes, les MPP (Multipotents Progenitors) (Martinez-Agosto et al., 2007). Ces MPPs sont divisés en 4 groupes (MPP1 à MPP4) selon leur potentiel à devenir myéloïde ou lymphoïde (Pietras et al., 2015) qui correspondent au point de distinction entre les deux lignées. La lignée lymphoïde s'initie avec les cellules progénitrices lymphoïdes communes (PLC) grâce à la surrégulation du récepteur de l'IL-7 et la sous-régulation des marqueurs de surface cKit et SCA1 (Stem Cell Antigen 1) (Kondo et al., 1997). Le PLC peut se décomposer en 2 sous-stades : ALP (All-Lymphoid Progenitor) puis BLP (B cell biased Lymphoid progenitor) (Figure 14). L'ALP correspond au progéniteur de toutes les lignées lymphoïdes (NK, LT et LB) tandis que le BLP ne génère que des LB (Boller et al., 2018). De façon intéressante, les BLPs montrent une expression précoce de gènes de différenciation terminale (Boller et al., 2018; Vilagos et al., 2012). Les BLPs se différencient ensuite en cellule Pro-B.

Le stade pro-B est divisé en 2 sous-stades : le stade pro-B précoce et le stade pro-B tardif. Pendant ces 2 sous-stades, la chaîne lourde est recombinaisonnée. Lors du stade pro-B précoce, le réarrangement entre D et J est réalisé, puis au stade pro-B tardif, l'association DJ est réarrangée avec un segment V. Les cellules pro-B se différencient alors en cellules pré-B qui se composent aussi de 2 sous-stades : le stade grand pré-B et le stade petit pré-B. Pendant le stade grand pré-B, le pré-BCR est formé qui est composé de la chaîne lourde réarrangée associée à une pseudo chaîne légère formée des protéines Vpré-B et  $\lambda 5$  (Mårtensson et al., 2010; Zhang et al., 2004) ainsi qu' $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$ , le complexe de signalisation. Si le pré-BCR est productif (c'est-à-dire que l'association V(D)J permet de produire une chaîne lourde fonctionnelle), il émet un signal de survie à la cellule via l'IL-7 (Marshall et al., 1998; Patton et al., 2014).

La cellule va alors proliférer et se différencier en stade petit pré-B. A ce stade, la cellule initie la recombinaison de la chaîne légère (association VL-JL). Cette recombinaison est régulée par le pré-BCR et par une diminution de la signalisation par l'IL-7 (Clark et al., 2014). Le locus IGK est réarrangé en premier et si le produit obtenu n'est pas fonctionnel alors c'est le locus IGL qui est réarrangé (Mårtensson et al., 2010). Si les réarrangements des chaînes lourdes et légères sont productifs alors le second allèle subit l'exclusion allélique (Corcoran,



**Figure 14 : Représentation schématique de la lymphopoïèse B.**

La lymphopoïèse B est le processus de maturation des lymphocytes B dans la moëlle osseuse. La cellule souche hématopoïétique (CSH) va donner naissance à une cellule progénitrice multipotente (MPP) qui peut s'orienter vers la lignée lymphoïde et donner une cellule progénitrice lymphoïde commune (PLC). Par la suite, la PLC devient une cellule pro-B. A ce stade, les chaînes lourdes sont réarrangées puis, au stade pré-B, les chaînes lourdes s'associent avec des pseudo chaînes légères pour former le pré-BCR. Si le pré-BCR passe la sélection, les chaînes légères réarrangent ce qui donne naissance à un BCR de type IgM exprimé en surface chez le LB immature. Si cette cellule passe la sélection via son BCR alors elle donne naissance à un LB mature naïf caractérisé par la co-expression d'IgM et d'IgD qui rejoint la circulation périphérique.

2005). Tout cela va mener à l'expression du BCR où la chaîne légère recombinée remplace la pseudo chaîne légère, une IgM de surface est alors exprimée, caractéristique des cellules B immatures.

Ces cellules vont subir une sélection qui élimine les LB autoréactifs (c'est-à-dire des LB exprimant une Ig reconnaissant le soi) et garde uniquement les LB ayant acquis la tolérance vis-à-vis du soi (Sandel and Monroe, 1999). Ces cellules, appelées cellules B matures naïves, vont ensuite quitter la MO pour se rendre dans les organes lymphoïdes secondaires, souvent la rate, pour finir leur maturation. Elles sont caractérisées par la co-expression des isotypes IgM et IgD à leur surface (Chung et al., 2003) et ne seront actives qu'après rencontre avec un Ag exogène. Les LB matures actifs peuvent ensuite se différencier en plasmocyte sécréteurs d'Ac ou subir la recombinaison de classe (CSR, changements de l'isotype du BCR) et les hypermutations somatiques (SHM, mutations dans les domaines variables pour augmenter l'affinité BCR-Ag (notions abordées en 2.4)) afin que leur BCR soit plus spécifique de l'Ag (Nutt et al., 2015).

### 2.3.3. Régulation de la lymphopoïèse B

L'hématopoïèse est un mécanisme finement régulé dont la fonction est d'assurer un équilibre entre maintien et différenciation des CSH pour produire les différentes cellules sanguines (Figure 13) et donc d'assurer l'homéostasie de l'organisme. Le maintien des CSH est notamment assurée par la fixation du facteur de croissance SCF (Stem Cell Factor) sur les CSH qui est synthétisé par les cellules stromales (Ding et al., 2012; Sugiyama et al., 2006). CXCL12 (ou SDF-1 pour Stromal cell Derived factor 1) est synthétisé par les cellules stromales et se fixe au récepteur CXCR4 présent à la surface des CSH. Sa fixation engendre différentes voies de signalisation permettant la différenciation des CSH en MPPs. (Nagasawa, 2015; Sommerkamp et al., 2021). Plusieurs facteurs vont ensuite permettre d'orienter la différenciation des MPPs vers la lignée lymphoïde. Ainsi, le facteur de transcription Ebf1 en diminuant l'expression des FdTC/EBP $\alpha$  et PU.1 va orienter les MPP vers la lignée lymphoïde (Lenaerts et al., 2022; Mak et al., 2011; Pang et al., 2018) tandis qu'une augmentation de leurs expressions va les orienter vers la lignée myéloïde (DeKoter and Singh, 2000). De même, l'activation du récepteur Flt3 qui est régulé par la protéine Hoxa9 (Gwin et al., 2013) va induire l'expression de gènes lymphoïdes spécifiques comme *E2a*, *Il17r $\alpha$*  et *Ebf1* (Boller and Grosschedl, 2014).

L'engagement du PLC en LB est régulé par l'expression de Pax5 qui réprime les gènes des autres lignées lymphoïdes (comme *Notch1* pour les LT) et induit l'expression des gènes spécifiques des LB comme *Cd19*, *Ig $\lambda$ 5* et *Cd79a* de façon simultanée (Cobaleda et al., 2007; Souabni et al., 2002). Pax5 est aussi être exprimé du pro-B au B mature permettant le maintien de la différenciation en LB ainsi qu'IKAROS puisque sa délétion provoque un blocage de la lymphopoïèse B en diminuant très fortement les cellules pro- et pré-B et les protéines initiatrices de la recombinaison V(D)J (Heizmann et al., 2018; Kirstetter et al., 2002). L'IL7 et son



récepteur sont deux autres acteurs essentiels à lymphopoïèse B. En effet, l'IL-7 permet la prolifération et la survie des B tout au long de la lymphopoïèse et régule l'activité d'E2a et d'Ebf1 nécessaires à la maturation en pro-B (Corfe and Paige, 2012). A ce stade, E2a et Ebf1 activent l'expression des protéines RAG1/2 (Miyazaki et al., 2020; Romanow et al., 2000) et permettent l'initiation du réarrangement entre les segments D et J de la chaîne lourde (Krangel, 2003). Ces deux facteurs permettent aussi le réarrangement de la chaîne légère (Romanow et al., 2000).

Enfin, la formation du pré-BCR pendant le développement permet de réguler et sélectionner les LB fonctionnels (Mårtensson et al., 2010).

Il est cependant important d'indiquer qu'il existe des différences de régulation entre Hommes et souris même si les points abordés sont communs aux deux espèces, par exemple la lymphopoïèse B murine dépend beaucoup plus de la signalisation de l'IL-7 que chez l'humain où elle dépend plus de la signalisation du pré-BCR (Korzhenevich et al., 2023).

### **2.3.4. Sélection des lymphocytes B**

#### **2.3.4.1. Sélection par le pré-BCR**

Pendant leur développement, les LB subissent plusieurs points de contrôle afin de vérifier qu'ils sont bien fonctionnels et non autoréactifs. L'autoréactivité se définit comme la capacité d'un LB à ne plus discriminer le « soi » du « non-soi », le LB reconnaît et attaque donc les éléments du soi, ce qui est délétère pour l'organisme. Un premier point de contrôle se trouve au stade pré-B quand le pré-BCR est formé. Ce premier point de contrôle consiste en l'évaluation du réarrangement de la chaîne lourde et l'expression d'une chaîne lourde d'isotype  $\mu$  fonctionnelle (Mårtensson et al., 2010). Pour rappel, le pré-BCR est formé d'une chaîne lourde de type  $\mu$ , d'une pseudo chaîne légère (formée de VpréB et  $\lambda 5$ ), et de l'hétérodimère de signalisation  $Ig\alpha/\beta$  (Rickert, 2013). Actuellement, les mécanismes moléculaires responsables de la signalisation, de la sélection du pré-BCR et de son évaluation ne sont pas encore totalement élucidés. Cette signalisation pourrait être soit ligand-dépendante soit ligand-indépendante.

La sélection du pré-BCR ligand-dépendante serait médiée par la partie  $\lambda 5$  de la pseudo chaîne légère, qui s'accroche à la galactine-1 (uniquement chez l'homme) et l'héparane sulfate exprimées par les cellules stromales. Cet ensemble constituerait le signal de sélection (Bradl et al., 2003; Elantak et al., 2012; Espeli et al., 2009). Récemment, une équipe a montré comment la galactine-1 interagit avec le pré-BCR (Tourarin et al., 2024). La galactine-1, sécrétée par les cellules stromales, se fixerait au pré-BCR par des ligands glycosylés. La signalisation engendrée par cette interaction provoquerait la phosphorylation des motifs ITAMs présents



sur Ig $\alpha$ / $\beta$ . Cette phosphorylation activerait différentes voies de signalisation qui réguleraient le pré-BCR et permettra sa sélection ou non (Rossi et al., 2006; Touarin et al., 2024). Concernant l'héparane sulfate, il se pourrait que l'interaction de la queue de  $\lambda 5$  avec cette dernière amplifie les signaux de prolifération des cellules pré-B (Vettermann et al., 2008).

La sélection ligand-indépendante ou autonome a été proposée après avoir observée des LB exprimant un pré-BCR proliférer en l'absence de cellules stromales en culture (Rolink et al., 2000). Dans ce modèle, il semblerait que plusieurs pré-BCR s'auto agrègent entre eux par leurs résidus arginines contenus dans  $\lambda 5$  provoquant une signalisation de sélection (Elantak et al., 2012; Vettermann et al., 2008). Il a été proposé que ces deux modes de signalisation travailleraient de façon synergique en promouvant l'activation ou la compensation pour chacune de ces voies s'il l'une ou l'autre n'est pas suffisante (Übelhart et al., 2015). Dans tous les cas, ces différentes études montrent l'importance de  $\lambda 5$  dans ce processus.

Enfin, des mutations dans les gènes codant des éléments du pré-BCR ont montré l'importance d'avoir un pré-BCR complet. Ainsi, des patients présentant une mutation dans le domaine constant de la chaîne lourde (Ig $\mu$ ) contractent des infections récurrentes et ont un nombre très bas de LB matures (Lopez Granados et al., 2002; Yel et al., 1996). En effet, si la cellule est incapable de former un pré-BCR complet à sa surface, elle sera éliminée par apoptose, il s'agit d'environ 75% des cellules pré-B. Les cellules sélectionnées vont ensuite débiter le réarrangement de la chaîne légère du BCR pour devenir des B immatures.

#### 2.3.4.2. Sélection par le BCR

Une seconde sélection a lieu quand les chaînes lourdes et légères sont recombinaisonnées et que le BCR de type IgM est exprimé à la surface du LB immature pour éviter la sortie de la MO de cellules auto-réactives, c'est la tolérance centrale. Les LB immatures vont interagir via leur BCR avec les Ag du soi de l'environnement médullaire et la réaction de la cellule va définir son avenir. Le mécanisme de sélection repose sur le modèle « Boucle d'Or » où seul un LB avec un BCR ayant une réponse intermédiaire est gardé (Nemazee, 2017). La fixation de l'Ag du soi sur le BCR va entraîner l'activation de plusieurs processus pour essayer de réduire l'auto-réactivité du BCR ou éliminer le LB possédant un BCR autoréactif.

La réduction de l'autoréactivité est le premier mécanisme mis en jeu. Dans ce cas, il y a édition du récepteur de la cellule où un réarrangement de la chaîne légère va avoir lieu pour tenter de créer un BCR moins autoréactif qui passera la sélection (Nemazee, 2017, 2006; Radic et al., 1993). Ce mécanisme est permis par l'internalisation du BCR après fixation à l'Ag du soi, qui entraîne une réduction de la signalisation de PI3K et *in fine* augmente l'expression des protéines RAG1/2 et permet l'édition du récepteur (Pelanda et al., 2022;



Schram et al., 2008; Verkoczy et al., 2007). L'édition du récepteur permet de sauver une partie des BCR autoréactifs mais la durée de vie du LB immature étant courte, si l'édition du récepteur n'est pas fonctionnelle rapidement, il subira l'apoptose (Hartley et al., 1993; Vela et al., 2008). Il est d'ailleurs important de noter que l'édition du récepteur permet une plus grande utilisation des chaînes légères  $\lambda$ , ce qui augmente la diversité du répertoire BCR (Nemazee, 2017).

L'élimination des LB portant un BCR autoréactif est un processus appelé délétion clonale. Si le BCR est trop autoréactif alors le LB entrera en apoptose et sera éliminé.

A l'inverse, les BCR peuvent être trop peu réactifs, dans ce cas ils deviennent anergiques, c'est-à-dire que la cellule présente un état de non-réponse aux éléments qui lui sont présentés. Ces LB peu réactifs peuvent passer la sélection et sortir de la MO. Cependant, ces cellules ont une durée de vie très réduite quand elles sont en compétition avec des LB matures non autoréactifs, et elles meurent très vite dans l'organisme (Cyster et al., 1994; Fulcher and Basten, 1994).

Les LB immatures passant la sélection reçoivent un signal de survie via la voie de signalisation ERK/MAPK et PI3K et deviennent des LB matures naïfs. Ils migrent alors vers les organes lymphoïdes secondaires où ils subiront d'autres étapes de maturation et seront encore sélectionnés, c'est la tolérance périphérique (Chi et al., 2020).

## **2.4. Amélioration du BCR**

Comme nous l'avons vu, la recombinaison V(D)J crée le répertoire primaire de BCR, mais il ne suffit pas pour protéger l'organisme de tous les pathogènes existants. Pour protéger efficacement l'organisme, ce répertoire doit être amélioré par des modifications supplémentaires permises grâce à deux mécanismes : la commutation de classe (CSR) et les hypermutations somatiques (SHM). Ces modifications vont conduire à la création d'un répertoire secondaire permettant d'obtenir une réponse la plus pertinente possible face à un Ag donné. Ces mécanismes vont permettre de changer les propriétés biologiques de l'Ig et de modifier la région variable du BCR. Ils ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (Figure 2) après rencontre et activation avec un Ag. Ces deux mécanismes sont différents mais partagent plusieurs enzymes dont AID (Activation-induced cytidine deaminase) qui est la plus nécessaire. Ces deux mécanismes sont présentés très brièvement dans les sections suivantes.

### **2.4.1. La commutation de classe**



La commutation de classe correspond au changement d'isotype de chaîne lourde. Les LB matures subissent la CSR pour remplacer les exons C $\mu$ /C $\delta$  par un 7 des autres exons CH situés en aval de C $\delta$ . Chaque exon CH va donner un isotype d'Ig avec des propriétés effectrices et fonctions spécifiques, comme présentées dans la partie 2.1.2 (Hwang et al., 2015). En amont de chaque gène constant (excepté C $\delta$ ) se trouvent des régions switch S, correspondant à des séquences d'ADN répétitives introniques au motif [(GAGCT), (GGGGT)]. AID va initier une DSB dans deux régions S et entraîner une recombinaison-délétion entre deux séquences S pour résulter au remplacement du CH préalablement exprimé et donc à un changement d'isotype. Ces DSB seront réparées par la voie C-NHEJ (Chi et al., 2020; Yan et al., 2007).

### 2.4.2. Les hypermutations somatiques

Les hypermutations somatiques (SHM) étendent et augmentent la diversité dans les régions CDR1 à 3. Les SHM font parties des processus de maturation des BCR qui ont lieu après la rencontre avec l'Ag et ne concernent que les réarrangements V(D)J. Ils ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. La SHM va introduire des mutations somatiques ponctuelles à un taux extrêmement élevé (1 mutation par 1000 pb par division cellulaire) qui s'accumulent au cours de la réponse immunitaire. Les cellules qui expriment les mutations sont ensuite sélectionnées contre un Ag donné. Les mutations ont surtout lieu dans les hotspots qui sont des motifs d'ADN particulièrement sujets à des mutations répondant au motif RGYW. AID va agir sur la séquence ADN, modifier un nt et provoquer un alignement anormal (mismatch) entre les deux brins. Les systèmes de réparation de l'ADN s'activent alors ce qui aboutit à une transition (mutation ponctuelle dans l'ADN qui remplace une purine par une autre ou une pyrimidine par une autre) ou à une transversion (mutation ponctuelle dans l'ADN qui remplace une purine par une pyrimidine ou inversement) dans la séquence d'ADN modifiant ainsi la séquence de base (Chi et al., 2020; Hwang et al., 2015; Wang, 2020).

## II. LE STRESS

### 1. Généralités

#### 1.1. Historique

C'est au cours du 19<sup>ème</sup> siècle qu'apparaît la notion de stress. En 1865, Claude Bernard, un médecin français, décrit la notion d'équilibre du « milieu intérieur » dont l'adaptation face aux changements d'environnements est maintenue par différents mécanismes assurant stabilité et constance (Bernard and Dagognet, 2008). Par la suite, le physiologiste américain Cannon, reprend ce concept de milieu intérieur qu'il appelle homéostasie (Cannon, 1934). Il décrit l'homéostasie comme un mécanisme de réponse au stress et formule des concepts de réponse au stress comme le « fight or flight » (combat ou fuite) (Cannon, 1934). Le « fight or flight » définit qu'une menace à l'homéostasie entraîne une décharge du système nerveux (SN) autonome amenant l'animal



à lutter ou à fuir. Cette décharge est notamment permise par une molécule qu'il nomme la sympathine (c'est la noradrénaline) synthétisée par les glandes surrénales en cas de situation stressante. Les travaux de Cannon ont été complétés par ceux de l'endocrinologue Hans Selye en 1936. Hans Selye définit le stress comme une réponse physiologique non spécifique à tout besoin ou menace que rencontre l'organisme (Selye, 1974, 1936). Cette réponse au stress est nommée syndrome général d'adaptation.

## 1.2. Définitions

Le syndrome général d'adaptation se décompose en trois phases :

- Phase d'alarme : c'est la réponse « fight or flight » de Cannon qui se met en place rapidement et est de courte durée. L'organisme va mobiliser toutes ses ressources énergétiques pour répondre au stress.
- Phase de résistance : elle se met en place dans le cas d'un stress qui perdure. Comme le stress persiste, l'organisme puise dans ses ressources afin de retourner à un état d'équilibre, donc rétablir l'homéostasie face au stressor (l'élément stressant).
- Phase d'épuisement : si le stressor est trop long, répété et de forte intensité alors l'organisme épuise ses ressources énergétiques et ne parvient pas à rétablir l'homéostasie aboutissant souvent à des effets délétères sur les composantes et fonctions de l'organisme.

Hans Selye a décrit deux types de stress : le « eustress » qui est positif pour l'organisme (sensation de satisfaction) et le « distress » qui est négatif pour l'organisme (sensation de frustration et d'anxiété) dont la perception et la sévérité sur l'organisme sont individu-dépendantes. Aujourd'hui, deux grands types de stress sont considérés : le stress aigu et le stress chronique. Le stress aigu correspond à un stress rapide, de courte durée et d'intensité modérée à élevée dont la réponse physiologique est rapide et s'arrête nette lorsque le stressor disparaît, c'est le cas par exemple quand un étudiant passe un examen (Corbett et al., 2017). Le stress chronique est caractérisé par des événements stressants prolongés et répétés dans le temps dont le niveau d'intensité est variable et dont la résultante est délétère pour l'organisme. Le stress aigu a donc un effet plutôt positif (Dhabhar et al., 1997, 1996). Le stress chronique, quant à lui, a un effet négatif voire délétère pour l'organisme puisqu'il favorise le développement de pathologies comme les maladies cardiovasculaires, le cancer ou les maladies mentales (Dai et al., 2020; Godbout and Glaser, 2006). Il faut toutefois noter que bien que le stress aigu ait un effet positif, s'il est trop intense, il peut provoquer un déséquilibre émotionnel et engendrer divers troubles psychiatriques tels qu'un syndrome d'anxiété généralisé ou une dépression (Cahill et al., 2005).



Un organisme se trouve régulièrement confronté à de nombreux stressseurs qui sont classés en deux catégories: les stress socio-environnementaux et les stress physico-chimiques. Les stress socio-environnementaux regroupent la psychologie et l'état émotionnel de l'individu, il y a par exemple les relations interindividuelles ou l'état de santé de l'individu. Les stress physico-chimiques impactent l'organisme de manière physique et/ou chimique avec par exemple la pollution ou les changements de température.

## **2. Mécanismes de réponses au stress**

### **2.1. Système sympathique, phase d'alarme**

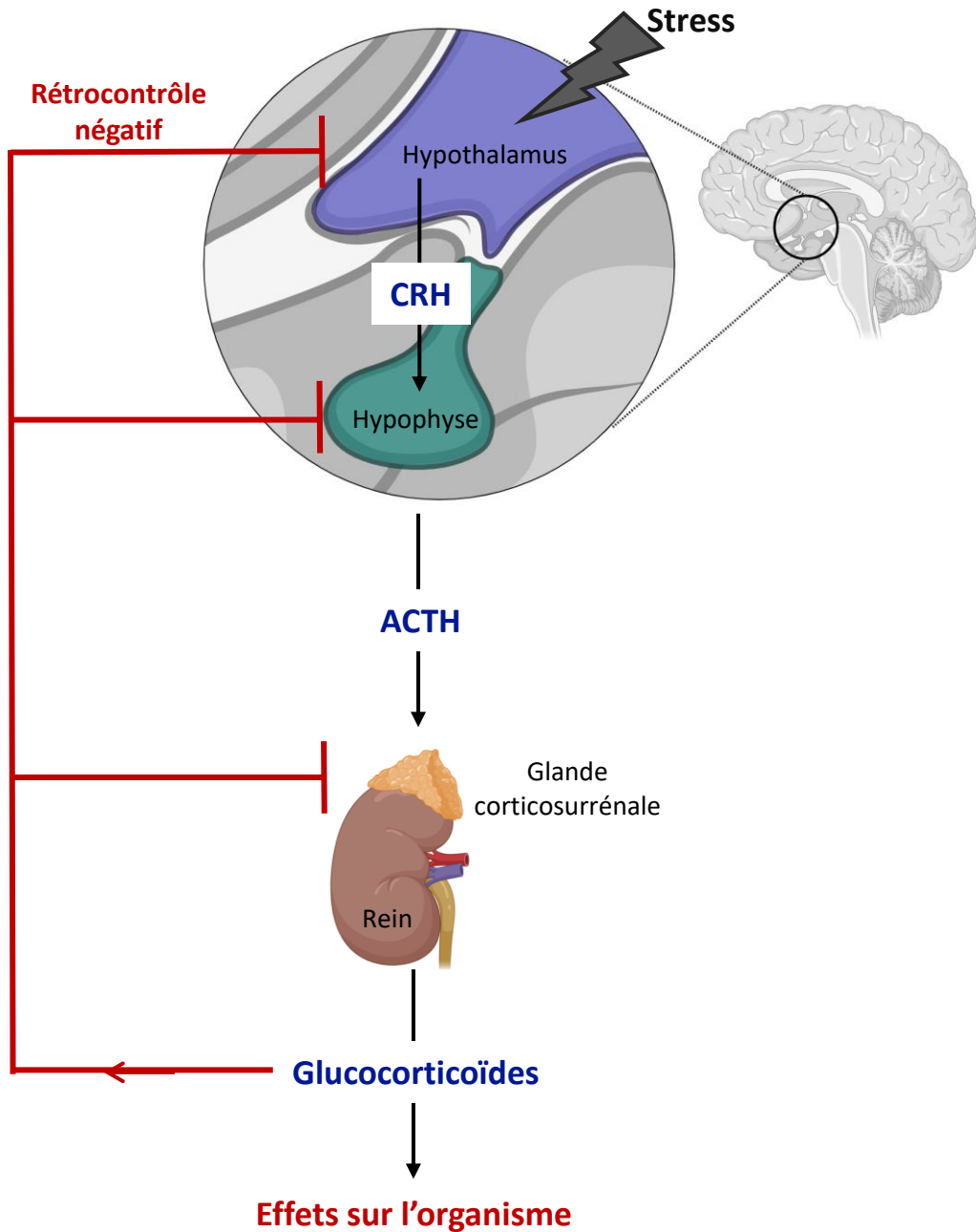
Pour savoir comment répondre au stress, l'organisme doit détecter et identifier le type de stress dont il s'agit. Les stress physico-chimiques sont détectés par des récepteurs périphériques comme les mécanorécepteurs et/ou les chimiorécepteurs émettant des signaux somatosensoriels jusqu'au système nerveux central (SNC) via des fibres nerveuses sensitives (Chen and Lyga, 2014). Les stress socio-environnementaux sont détectés par les organes sensoriels dont les informations sont transmises au SNC par les innervations afférentes (Godoy et al., 2018). Au niveau du SNC, il existe un circuit neurone déterminant le degré de menace et de stress d'une information, ce réseau de neurones compare l'information reçue par les organes sensoriels aux expériences passées de l'individu. C'est le rôle du système limbique composé de l'hippocampe, de l'amygdale et du cortex préfrontal (Ulrich-Lai and Herman, 2009).

Lorsque le système limbique détermine que le stimulus est un événement stressant, il active l'hypothalamus qui déclenche la réponse au stress. Pour se faire, l'hypothalamus active le SN sympathique via des médiateurs chimiques comme des catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine) qui vont activer les fonctions du processus de « fight or flight » (Goldstein, 1987; Palkovits, 1981). Ces médiateurs chimiques vont notamment provoquer une augmentation du rythme cardiaque, de la pression artérielle, une dilatation des pupilles ou encore mobiliser les réserves énergétiques de l'organisme (Ranabir and Reetu, 2011). Au contraire, les fonctions non indispensables au processus sont inhibées, c'est le cas par exemple de la digestion. C'est la phase d'alarme qui correspond au premier stade de réponse au stress.

## **2.2. Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, phases de résistance et d'épuisement**

### **2.2.1. Mécanisme d'action de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HSS)**

Lorsque le système sympathique n'est pas suffisant pour rétablir l'homéostasie d'un organisme stressé, le système hormonal nommé axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HSS) (ou axe corticotrope) s'active. L'activation de cet axe HSS constitue la phase de résistance, l'organisme va puiser dans ses réserves



**Figure 15 : Fonctionnement et régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HSS).**

Lorsqu'un stress est perçu par le système nerveux central, l'hypothalamus est activé et sécrète une hormone, la corticolibérine (CRH). Cette hormone entraîne la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) par l'hypophyse qui agit sur les glandes corticosurrénales activant la libération de glucocorticoïdes. Ces glucocorticoïdes ont des effets sur l'organisme; d'une part ils répondent aux stress et de l'autre ils s'autorégulent négativement en agissant sur l'ensemble de l'axe HSS que ce soit l'hypothalamus, l'hypophyse ou les glandes corticosurrénales.

énergétiques pour rétablir l'homéostasie. Si le stress est aigu, alors l'homéostasie est rétablie par une réponse comportementale. A l'inverse, dans le cas d'un stress chronique, la phase de résistance n'est pas suffisante pour rétablir l'homéostasie, les réserves énergétiques de l'organisme sont alors épuisées, c'est la phase d'épuisement. Durant cette phase, l'axe HSS est suractivé engendrant des modifications hormonales importantes ayant des effets souvent délétères sur différentes fonctions physiologiques.

Le système limbique active donc l'axe HSS via l'activation de l'hypothalamus. L'hypothalamus va produire de la corticolibérine (CRH) qui va se fixer à son récepteur présent à la surface des cellules de l'hypophyse qui vont alors libérer l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) dans la circulation sanguine. L'ACTH peut se fixer sur les glandes corticosurrénales via le récepteur MC2-R (Récepteur aux mélanocortines). La fixation induit la synthèse et la sécrétion d'hormones stéroïdes dont les glucocorticoïdes (GC) dans la circulation sanguine (cortisol chez l'Homme, corticostérone chez le rongeur) (Smith and Vale, 2006; Stephens and Wand, 2012) (Figure 15). Ces GC vont se fixer sur leurs récepteurs présents sur de nombreux organes et sont de deux types: les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) respectivement codés par les gènes *nr3c2* et *nr3c1* (De Kloet et al., 2005). Les deux types de récepteurs se différencient par leur localisation et leur affinité pour les GC (De Kloet et al., 1998). Les MR sont principalement localisés au niveau du système limbique et de l'hypothalamus et possèdent une affinité 10 fois supérieure par rapport aux GR (De Kloet et al., 1998). Les GR, quant à eux, sont trouvés au niveau du SNC et des organes périphériques (et notamment en surface des cellules immunitaires comme les LB). La différence d'affinité permet aux GR de ne s'activer qu'en cas de sécrétion massive de GC (Patel et al., 2000; Seckl et al., 1991).

GR et MR sont des récepteurs nucléaires et l'interaction ligand-récepteur permet leur translocation dans le noyau et ces récepteurs agissent en tant que FdT sur plusieurs cibles de l'ADN et particulièrement sur les GRE (Glucocorticoid Response Elements) situés sur les promoteurs de gènes cibles impliqués dans des fonctions régulées par le stress comme la prolifération, l'inflammation, la réponse immunitaire ou le métabolisme. Tout cela a pour but d'adapter l'organisme au stress et d'avoir un retour rapide à l'homéostasie dans la plupart des cas.

### **2.2.1. Régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HSS)**

Des fortes concentrations de GC sur le long terme sont néfastes pour l'organisme, c'est pourquoi il existe des mécanismes de régulation. Tout d'abord, il existe un rétrocontrôle négatif de l'axe HSS. Les GR détectent la quantité de GC dans l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes corticosurrénales. L'activation des GR va



conduire à la diminution de la production de CRH dans l'hypothalamus, d'ACTH dans l'hypophyse et de GC dans les glandes corticosurrénales (Figure 15) (Sheng et al., 2020; Smith and Vale, 2006).

Un autre mode de régulation est la balance entre les enzymes anabolisantes et catabolisantes. L'enzyme 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11 $\beta$ -HSD1) catalyse la réduction de la forme inactive en forme active des GC, donc la conversion de la 11-déhydrocorticostérone en corticostérone chez le rongeur et de la cortisone en cortisol chez l'Homme. L'enzyme 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 $\beta$ -HSD2) réalise la réaction inverse (Chapman et al., 2013). La présence de ces enzymes au sein de nombreux organes et la balance entre forme active et forme inactive régulent localement le niveau de GC (Chapman et al., 2013). Ces mécanismes régulent ainsi les GC pour limiter au maximum l'impact négatif des GC lors de l'exposition à de très fortes doses, sur le long terme et/ou de façon répétées.

### 3. Impact du stress sur le système immunitaire

Comme tout système, le SI est aussi impacté par le stress. Le stress aigu a été montré comme immunostimulateur alors que le stress chronique a un effet inhibiteur voire délétère sur le SI (Dhabhar and McEwen, 2007).

#### 3.1. Stress aigu

Le stress aigu va tout d'abord provoquer une redistribution des cellules du SI dans le sang et les tissus (Dhabhar et al., 2012, 1996). Chez la souris soumise à un stress aigu, une diminution des lymphocytes et monocytes et une augmentation des neutrophiles ont été observées, et globalement une diminution des leucocytes (Dhabhar et al., 1995, 1994), tandis que chez l'Homme, une tendance à l'augmentation des leucocytes a été observée lors d'un stress aigu (examen, compétition sportive par exemple) (Brosschot et al., 1994; Mills et al., 1995; Naliboff et al., 1991). La différence de réponse entre l'Homme et la souris peut s'expliquer le fait que les types de stress aigus testés sont différents selon les études et les perceptions souris/Homme du stress sont bien différentes. En effet, l'Homme va avoir tendance à mentaliser le stress, ce qui n'est pas le cas d'une souris dont le moindre faux pas en cas de stress peut lui être fatal. La différence de réponse au niveau leucocytaire peut également s'expliquer par une augmentation ponctuelle de certaines cellules comme les neutrophiles. En effet, les neutrophiles représentent 50% à 75% des cellules sanguines et une augmentation majeure de ces cellules augmentera fortement le taux de leucocytes dans le sang. Il est aussi à noter que la réparation des cellules du SI est différente chez l'Homme. Certaines études ne notent aucun changement dans les proportions de LTh et de LB (Naliboff et al., 1991) tandis que d'autres montrent une diminution de ces mêmes cellules dans le sang (Mills et al., 1995). Cela veut dire qu'un sein d'une même



espèce, selon le type de stress aigu, la résultante est différente, spécialement chez l'Homme où la perception et la réaction au stress aigu sont toutes deux subjectives et individu-dépendantes. L'exemple type est celui d'un étudiant avant un examen qui est pétrifié et d'un autre étudiant qui est comme à son habitude, c'est le même type de stress aigu sur la même espèce mais la perception et la réaction diffèrent complètement entre individus. Ce changement de distribution cellulaire peut aussi s'expliquer par la sécrétion de catécholamines pendant le stress. En effet, des souris subissant une ablation des glandes surrénales ne présentent plus de changement de distribution cellulaire en cas d'exposition à un stress aigu.

La redistribution des cellules du SI permettrait de préparer l'organisme à une nouvelle attaque pour augmenter sa défense et est généralement accompagnée d'une activation de la réponse immunitaire (Dhabhar et al., 1994; Dhabhar and McEwen, 1999). En effet, il a été montré que lors d'un stress aigu, la cicatrisation d'une plaie ou d'une infection est plus rapide (Deak et al., 1999; Dhabhar and McEwen, 1999; Kinsey et al., 2003), la redistribution leucocytaire pourrait donc être un mécanisme de protection pendant un stress aigu (Dhabhar, 2002). L'amélioration de la réponse immunitaire a d'ailleurs été montrée chez des souris immunisés. Des souris ayant subi un stress aigu avant immunisation développent une meilleure réponse immunitaire lors d'une seconde rencontre avec l'Ag. Un plus grand nombre de lymphocytes et de macrophages étaient présents sur le site de l'infection avec de plus fortes concentrations de cytokines pro-inflammatoires telles que le  $TNF\alpha$  et l' $IFN\gamma$ , nécessaires à l'infiltration et à l'activation des cellules sur le site de l'infection (Dhabhar, 2002; Dhabhar and Viswanathan, 2005). Cet effet immunostimulateur est aussi observé lors de vaccins avec une augmentation des Ac lors de vaccins à Ag thymo-dépendants mais aussi thymo-indépendants (Edwards et al., 2008).

Cet effet est probablement dû aux GC et aux GR se trouvant sur les cellules du SI. L'augmentation des GC pendant un stress aigu stimule les fonctions des cellules du SI. Ceci est confirmé par l'ablation des glandes surrénales qui provoque un arrêt de la production des GC et abolit l'effet immunostimulant du stress aigu. L'injection de GC à faible dose restaure cet effet (Dhabhar and McEwen, 1999).

Le stress aigu influence donc la localisation, l'activation ou encore la maturation des cellules du SI et est donc bénéfique dans la plupart des cas. Néanmoins, il s'avère néfaste dans les cas d'allergies, de maladies infectieuses et maladies auto-immunes (MAI).

### 3.2. Stress chronique

Les stress chroniques sont considérés comme délétères pour l'organisme voire immunosuppresseurs (Dhabhar et al., 1997; Godbout and Glaser, 2006; Saul et al., 2005; Sklar and Anisman, 1981). En effet, des

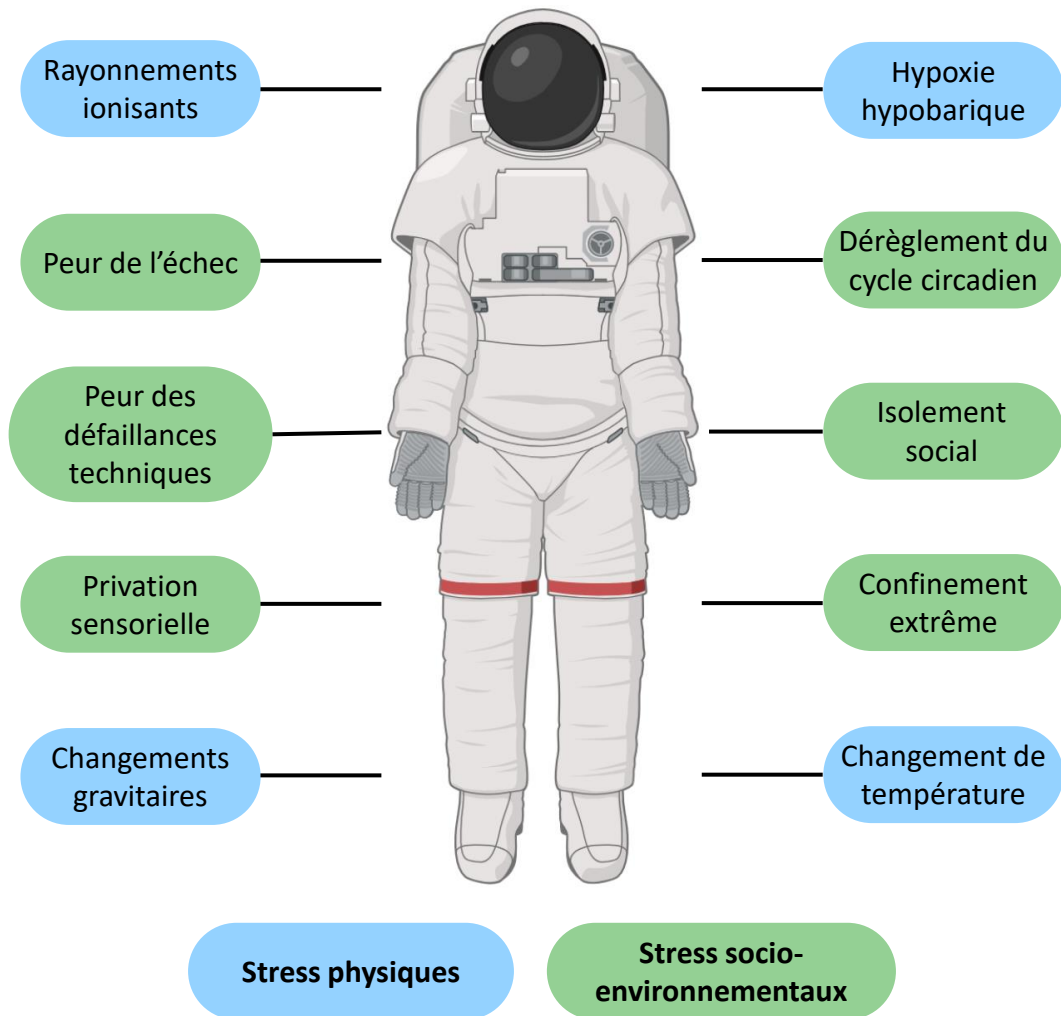


souris soumises à des stress chroniques suivis d'une stimulation au LPS (lipopolysaccharides) présentent une augmentation accrue de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  tandis que des souris non stressées ne présentent aucune augmentation de ces cytokines (Frank et al., 2007; Wohleb et al., 2011). Une autre équipe a mis en évidence qu'une vaccination chez des souris soumises à 3 semaines de stress chroniques est beaucoup moins efficace que chez des souris non stressées (Dhabhar et al., 1995). Ces éléments tendent à montrer la dérégulation du SI lors de stress chroniques.

Au contraire du stress aigu, dont les conséquences peuvent être différentes entre Hommes et souris, ces résultats-là sont similaires renforçant l'hypothèse de l'effet négatif des stress chroniques sur l'organisme et notamment sur le SI. Des effets négatifs ont aussi été montrés sur les DC (Segura and Amigorena, 2013). Les stress chroniques provoquent également une diminution du nombre de NK et une baisse de leur activité cytotoxique rendant l'hôte vulnérable (Bonneau, 1991; Dragoş and Tănăsescu, 2010; Segerstrom and Miller, 2004). De la même façon, les lymphocytes B et T y sont sensibles puisque leur maturation, prolifération et activation sont diminuées (Bonneau, 1991; Dragoş and Tănăsescu, 2010). Concernant les LT, il y a par exemple un changement de profil des LTh en faveur du type Th2 favorisant la sensibilité du sujet envers les infections, MAI et cancers (Elenkov, 2004). Pour les LB, les réponses aux vaccins sont altérées, en effet les taux d'Ac sont fortement réduits chez des souris ou des humains soumis à de forts stress chroniques psychologiques (Glaser et al., 2000; Jabaaij et al., 1993). Ce type de stress est aussi un facteur aggravant dans le développement des cancers (Dai et al., 2020). Une des études l'ayant prouvé s'est faite en exposant aux UV des souris soumises à des stress chroniques ou non. Les tumeurs des souris stressées se sont développées beaucoup plus rapidement et corrélaient avec un moins grand nombre de cellules du SI (Saul et al., 2005). Globalement, tous ces résultats font montre de l'effet inhibiteur sur le SI rendant l'organisme plus vulnérable aux infections, aux MAI ou encore aux cancers.

Ces effets sont essentiellement dus aux hormones de stress comme les GC ou les catécholamines. La plupart des cellules immunitaires possèdent des récepteurs aux hormones de stress et sont capables de capter les GC circulants (Miller et al., 1998). Les organes lymphoïdes qu'ils soient primaires ou secondaires y sont aussi sensibles et sont innervés par le SN sympathique. Cette innervation provoque une régulation directe par les catécholamines de la maturation, prolifération et activation des cellules du SI. Il est donc envisageable que la plupart des conséquences des stress chroniques sur le SI soit due à une surexposition des cellules aux hormones de stress. Ainsi, des souris ayant eu un fort taux de GC présentent une réduction de 50% de leurs LB périphériques qui est due à l'apoptose des progéniteurs de LB dans la MO (Garvy et al., 1993b, 1993a).

Cette dérégulation du SI est donc dangereuse pour l'organisme et augmente la susceptibilité à de multiples pathologies (métaboliques, cardio-vasculaires, immunitaires, cancers etc.) (Godbout and Glaser, 2006). De



**Figure 16 : Les différents types de stress rencontrés par les astronautes.**

Lors d'une mission spatiale, les astronautes sont soumis à de nombreux stress physiques (en bleu) et socio-environnementaux (en vert). Parmi les stress physiques, se trouvent les changements gravitaires (micro- ou hypergravité), les changements de température, les rayonnements ionisants et l'environnement perçu comme hypoxique et hypobarique. Parmi les stress socio-environnementaux, se retrouvent la peur de l'échec, la peur de défaillances techniques, la privation sensorielle, le dérèglement du cycle circadien, l'isolement social et le confinement extrême.

plus, de nombreuses études tendent à faire le lien entre immunosénescence (vieillesse du SI) et effets des stress chroniques car les deux sont très similaires (Bauer et al., 2009; De Punder et al., 2019).

### III. EXPOSOME SPATIAL

#### 1. Généralités

L'espace a toujours fasciné et émerveillé l'Homme, de Platon disant : « L'astronomie oblige l'âme à regarder vers le haut et nous conduit de ce monde à un autre », à Youri Gagarine, le 1<sup>er</sup> homme à se rendre dans l'espace, en passant par la fameuse Guerre des étoiles. L'espace a toujours été source d'inspiration, de curiosité et de recherche pour l'Homme. Cette source d'inspiration n'est pourtant pas l'un des milieux les plus attirants et d'un extrême qu'il est difficile d'imaginer. A bord de la station spatiale internationale (ISS), les astronautes, spationautes, cosmonautes ou taïkonautes disposent d'un lieu de vie mais aussi de travail nécessaire au bon déroulement des missions. Malgré cela, l'espace est composé de nombreux stress, ayant des conséquences délétères, qui composent l'exposome spatiale. Le terme astronaute sera utilisé dans le reste du texte pour désigner tout homme ou femme participant à des missions à bord de l'ISS ou à des voyages spatiaux.

L'exposome spatiale se définit comme une combinaison variable de stressseurs (physiques et socio-environnementaux) qui peut représenter une menace pour l'état de santé. Les études scientifiques pour en comprendre les conséquences sont limitées par le nombre réduit de vols et d'astronautes, l'envoi du matériel nécessaire souvent compliqué à mettre en place, et par le coût de ces études. A cela s'ajoute la difficulté de mener des études sur le long terme. Les conséquences de ces stress nombreux et délétères pour tous les systèmes physiologiques composant l'organisme ne sont donc aujourd'hui pas toutes connues.

#### 1.1. Stress physiques

Toutes les espèces terrestres se sont adaptées et ont évolués en fonction de la gravité terrestre de 1G (Figure 16). Dans l'environnement spatiale, il n'y a pas de gravité, on parle de microgravité (0G) en anglais et d'apesanteur en français. La microgravité est un stress important pour tout astronaute, connue pour avoir de fortes conséquences sur la physiologie. Durant un voyage de six mois à bord de l'ISS, un astronaute est soumis à six mois de 0G. Il est à noter qu'en cas de voyages spatiaux sur la Lune ou Mars, les voyageurs spatiaux seront soumis à des gravités différentes :  $1/6^{\text{ème}}$  de la gravité terrestre sur la Lune et  $1/3$  de la gravité terrestre sur Mars auxquelles les organismes ne seront pas habitués.

Les atterrissages et décollages des fusées provoquent aussi des phases d'hypergravité. Bien que courtes, ces phases sont extrêmement stressantes pour l'organisme qui est alors soumis à une gravité de 3 à 8 G, c'est-



à-dire, que l'astronaute ressent 3 à 8 fois sa propre masse corporelle (sans compter la masse du scaphandre). Ces changements gravitaires et particulièrement la microgravité sont responsables de nombreuses altérations physiologiques (Guéguinou et al., 2009; Jacob et al., 2023).

L'exposition aux rayonnements ionisants constitue un énorme risque lors des futures missions spatiales de longues durées car elle peut contribuer au développement de cancers (Durante and Cucinotta, 2008; Guéguinou et al., 2009). Les rayonnements cosmiques sont constitués de plusieurs choses : des rayons solaires (UV) et des rayons cosmiques (rayon gamma, rayons X etc.) ainsi que des particules chargées en haute énergie pouvant créer des cassures dans l'ADN. Bien que les astronautes soient protégés par l'ISS de ce genre de rayonnements, la protection n'est pas totale. En effet, les rayonnements cosmiques sont de très hautes énergies et très pénétrants (Nelson, 2016; Niemantsverdriet et al., 2012). Ainsi à bord de l'ISS, les astronautes sont généralement exposés à 1 mSv/jour de rayonnements ionisants (Zeitlin et al., 2013), ce qui équivaut à une dose de radiation moyenne de 100-200 mSv/an contre 50 mSv/an pour des personnels hospitaliers travaillant en radiologie (Cucinotta and Durante, 2006; Durante and Cucinotta, 2008). Comme pour la microgravité, il est nécessaire de réfléchir à cette exposition et à ses conséquences notamment pour les futurs voyages vers Mars pour lesquels il a été estimé qu'un voyageur sera soumis à environ 350 mSv/an de rayonnements ionisants pour une mission de 3 ans (Iosim et al., 2019; Zeitlin et al., 2013).

La température à l'intérieur de l'ISS est comprise entre 21 et 23°C notamment grâce à sa protection thermique très importante qui la protège des variations thermiques extérieures auxquelles elle est soumise. En effet, lorsque l'ISS passe du côté ensoleillé de la Terre, la température à sa surface peut facilement atteindre les 100°C contre -100°C en passant dans l'ombre de la Terre avec une alternance de 45 minutes (Newman, 2000). De plus, les forces de frottements à l'extérieur du vaisseau peuvent aboutir à une augmentation de la température allant jusqu'à 2000°C et cela sans considérer la température de l'espace de -273°C. Ainsi, malgré l'importante protection, la température varie dans l'habitacle de l'ISS. De plus, ces fortes ou basses températures nécessitent, lors de sorties extravéhiculaires (EVA) ou lors des atterrissages/décollages des astronautes, le port d'un équipement spécifique contenant des régulateurs thermiques ; le scaphandre qui pèse environ 120 kg (c'est le cas du Orlan, le scaphandre russe).

Enfin, l'espace est un environnement hypoxique hypobarique, quasiment dépourvu d'oxygène et où la pression atmosphérique n'est pas suffisante pour garantir la bonne pression partielle de tous les gaz nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Malgré le fait que l'ISS apporte l'air et la pression nécessaire, il a été montré que l'organisme humain détecte cet environnement comme hypoxique hypobarique, ce qui peut avoir des effets néfastes pour les astronautes (Pagel and Choukèr, 2016).



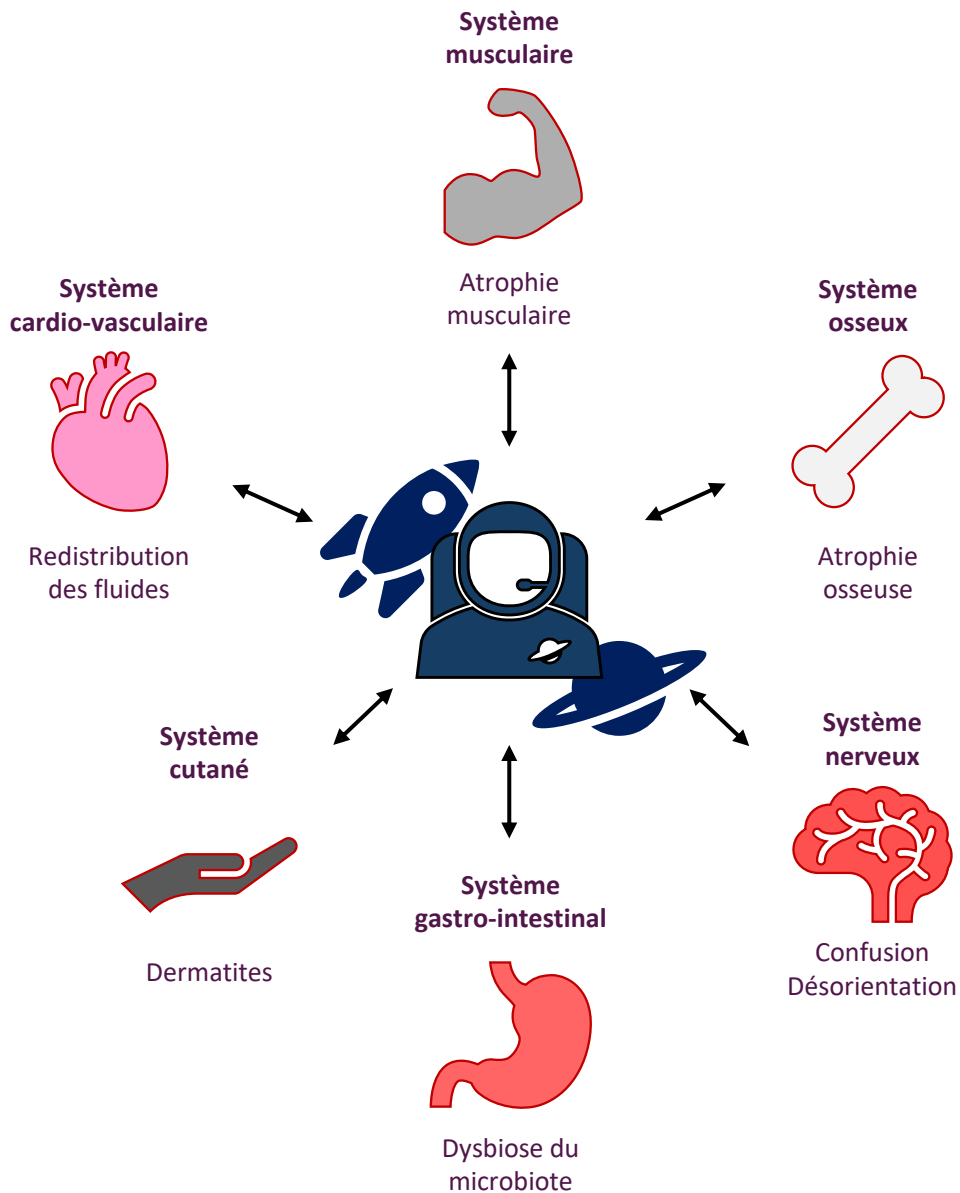
## 1.2. Stress socio-environnementaux

En plus des stress physiques, les astronautes sont soumis à de nombreux stress socio-environnementaux (Figure 16) car vivre dans l'ISS n'est pas chose simple, c'est un habitacle fermé avec entre autres peu de renouvellement d'équipage où il y a un confinement extrême, un isolement social et une privation sensorielle. La perturbation du cycle circadien est un facteur important de stress pour les astronautes. L'ISS tourne autour de la Terre à environ 28 000 Km/h provoquant une alternance jour/nuit toutes les 45 minutes soit 16 levers et couchers de soleil en 24h. Or, un rythme circadien normal est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme puisqu'il est considéré qu'environ 20% du génome serait sous son influence. La perturbation de ce cycle peut donc avoir de sérieux impacts sur l'astronaute comme des problèmes de sommeil, de performance ou encore de l'anxiété malgré leurs entraînements (Campos Costa et al., 2013; Fagiani et al., 2022; Wu et al., 2018).

La privation sensorielle touche les cinq sens chez l'astronaute. L'odorat et la vue sont peu stimulés à cause de la monotonie des informations visuelles et olfactives perçues. L'odorat peu stimulé va de pair avec celui du goût. En effet, les repas peu variés sont des plats lyophilisés concoctés par des chefs mais le fait d'être en OG altère le goût et la façon dont il est perçu. Le toucher est aussi altéré à OG. Quant à l'ouïe, elle est surstimulée de façon permanente à 60 dB ce qui est considéré comme un niveau sonore fatigant équivalent par exemple au passage de l'aspirateur au plus fort niveau d'aspiration sans arrêt (Thirsk et al., 2009). L'environnement de l'ISS produit des niveaux de bruits différents dus aux équipements tels que les ventilateurs, les équipements d'exercices physiques, les équipements pour la recherche menée à bord ou encore les équipements nécessaires à la survie de l'équipage. Les astronautes sont donc exposés non-stop à une surstimulation auditive que ce soit pendant leur sommeil ou non. Toutes ces modifications sensorielles peuvent mener au développement d'anxiété, de problèmes de concentration ou empêcher un repos efficace de l'équipage par exemple (Limardo et al., 2013).

L'exploration spatiale provoque également un isolement social et un confinement extrême. Les astronautes font face à de longues périodes loin de la Terre, de leurs proches et de leurs cultures dans un habitacle clos où ils devront rester avec les mêmes personnes lors de leurs missions. Ce sont des forts stressés émotionnels, considérés souvent comme les plus sévères (Kanas et al., 2009). A cela s'ajoute la distance ISS-Terre pouvant créer un autre stress émotionnel qui réduit la possibilité de traitements médicaux, les délais de communication et l'impossibilité d'une évacuation rapide ou immédiate pendant les missions.

Pendant leurs missions, les astronautes sont tenus d'effectuer différents travaux pour la recherche ou encore pratiquer des EVAs. Les manipulations effectuées sur l'ISS sont coûteuses et complexes pouvant



**Figure 17 : Impact de l'exposome spatial sur l'organisme.**

Lors d'une mission spatiale, un astronaute est soumis à de nombreux stress physiques et socio-environnementaux qui impactent son organisme de manière délétère. Chaque système physiologique est touché. Parmi ces effets sont connus par exemple : des atrophies osseuses et musculaires, une redistribution des fluides, des dermatites, une dysbiose du microbiote ainsi que confusion et désorientation.

possiblement être perçues comme une peur de l'échec pour un astronaute, c'est aussi le cas lors d'EVA où l'astronaute se doit de sortir dans l'espace afin d'effectuer sa mission. Le risque d'une défaillance technique, puisque rien n'est jamais parfaitement sûr, peut être source d'anxiété pour les astronautes.

Combinés, tous ces stress peuvent avoir des conséquences délétères sur la santé mentale et physique des astronautes et ceci malgré leur entraînement, et peut conduire à des syndromes dépressifs (Yin et al., 2023).

## 2. Effets de l'exposome spatial sur l'organisme

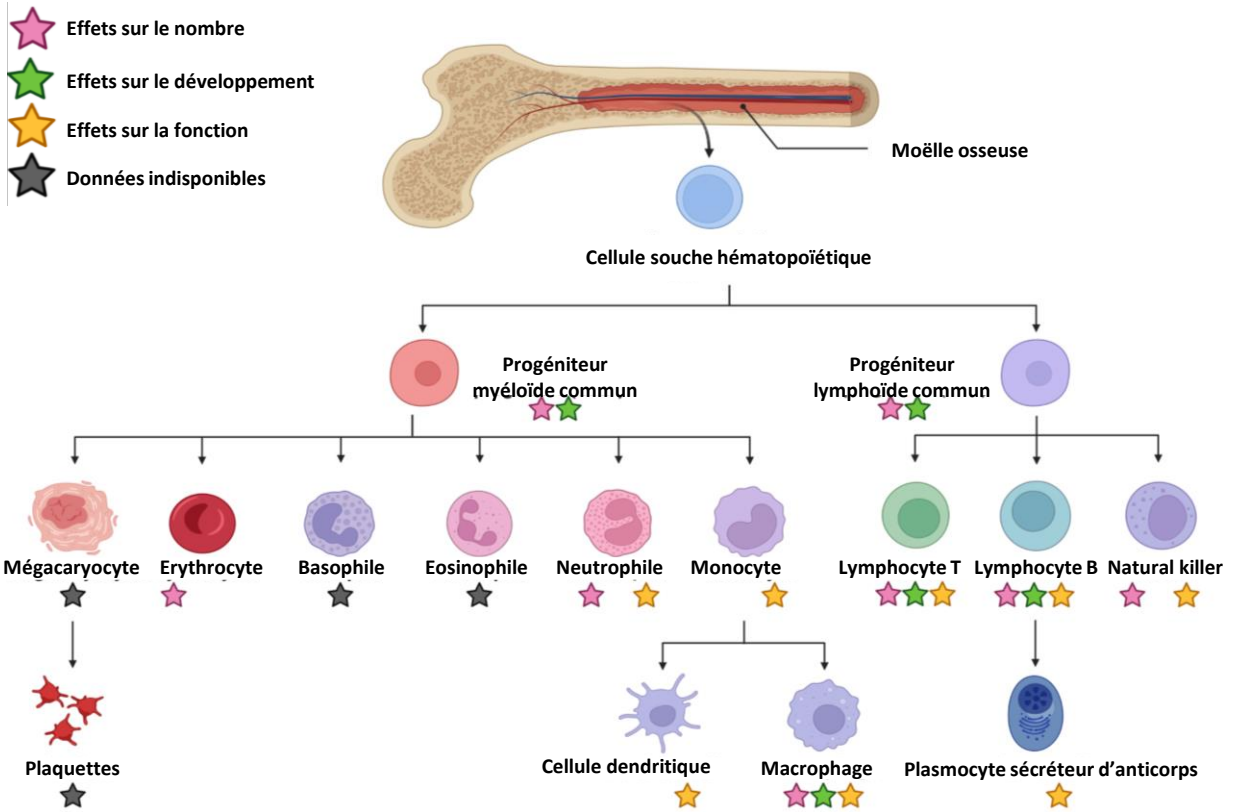
L'exposome spatial altère l'ensemble des systèmes physiologiques de l'organisme (Figure 17) (Guéguinou et al., 2009; Krittanawong et al., 2022).

L'un des premiers effets observés est la redistribution des fluides corporels causée par la OG. Les fluides se déplacent vers la tête et diminuent d'environ 10% dans les membres inférieurs (Williams et al., 2009). Cette redistribution conduit à une décharge du système cardio-vasculaire pouvant résulter en une atrophie cardiaque. Il y a également une altération de la physiologie cardio-vasculaire avec par exemple des réductions du volume de sang circulant (due en partie à la redistribution des fluides), de la pression diastolique ou encore de la contractilité du cœur (Patel, 2020; Perhonen et al., 2001). La redistribution des fluides engendre aussi une anémie due à une diminution du volume de plasma (Alfrey et al., 1996), accompagnée d'une diminution du taux d'érythrocytes via la réduction du taux d'érythropoïétine (Williams et al., 2009).

De plus, l'exposome spatial affecte le système gastro-intestinal entraînant des syndromes aigus d'entérite (diarrhée, vomissements) probablement liés aux changements gravitaires (Crucian et al., 2016; Thornton et al., 1987; Turrioni et al., 2020). De nombreuses études ont aussi mis en évidence une dysbiose du microbiote intestinal chez des modèles animaux et chez les astronautes (Garrett-Bakelman et al., 2019; Voorhies et al., 2019). L'exposome spatial altère également le système cutané avec notamment une sécheresse sévère, une cicatrisation plus lente et une prévalence plus grande aux dermatites (Dunn et al., 2018).

Les changements gravitaires de l'exposome spatial touchent le système musculosquelettique via des atrophies osseuses et musculaires. En effet, un astronaute peut perdre plus de 30% de sa masse musculaire et 12% de sa masse osseuse (Chang et al., 2016; Williams et al., 2009).

Plusieurs conséquences existent sur le système nerveux, notamment le mal de l'espace (space motion sickness) qui déstabilise la proprioception jusqu'au retour de mission et est lié à la perte des signaux de la gravité et au déséquilibre de l'oreille interne (Clément et al., 2013; Harris et al., 2017; Young et al., 1984). Le



**Figure 18 : Effets des stress associés aux vols spatiaux sur le nombre, le développement et la fonction des cellules immunitaires.**

Les cellules immunitaires dérivent de cellules souches hématopoïétiques auto-renouvelables. Ces cellules se différencient en cellules progénitrices myéloïdes communes et en cellules progénitrices lymphoïdes communes. Les cellules progénitrices myéloïdes donnent naissance aux mégacaryocytes, érythrocytes, basophiles, éosinophiles, neutrophiles et monocytes. Ces derniers peuvent devenir des cellules dendritiques ou des macrophages. Les cellules progénitrices lymphoïdes communes se différencient en cellules T, en cellules B qui peuvent donner naissance à des plasmocytes, et en cellules tueuses naturelles (NK). Les étoiles de couleurs indiquent si les facteurs de stress associés aux vols spatiaux affectent le nombre (rose), le développement (vert), et/ou la fonction (jaune) de chaque type cellulaire. L'étoile noir indique un manque de données.

(Source : Jacob et al., 2023)

syndrome neuro-oculaire associé au vols spatiaux provoque un gonflement de la rétine, déstabilisant la vue et participant aussi au mal de l'espace (Mader et al., 2011). Des conséquences comportementales existent dont le syndrome du brouillard spatial (space fog) se traduisant par des déficits cognitifs (manque d'attention, perception du temps altérée etc.) chez l'astronaute surement dus aux nombreux stress socio-environnementaux, leurs conséquences et surtout au manque de sommeil (Barger et al., 2014).

### 3. Effets de l'exposome spatial sur le système immunitaire

#### 3.1. Effets sur le système immunitaire inné

Les neutrophiles sont les plus abondantes des cellules sanguines, le type le plus abondant de granulocytes et les premiers répondeurs sur le site de l'infection (Figure 18). Si le développement des neutrophiles et/ou ses fonctions sont anormales alors une immunodéficience ou des réactions inflammatoires aberrantes sont induites (Keszei and Westerberg, 2014). Ainsi, il a été montré que le nombre de progéniteurs des granulocytes est diminué chez des rongeurs ayant volés (Ichiki et al., 1996; Sotnezova et al., 2017). De plus, le nombre de neutrophiles augmente après un vol spatial de court ou long terme mais leurs capacités phagocytaires sont fortement diminuées (Guéguinou et al., 2009; Kaur et al., 2004). Il a aussi été récemment montré que le ratio neutrophiles sur lymphocytes (NLR) augmentait chez les astronautes mais aussi lorsque des leucocytes sont soumis à une microgravité simulée (sOG) indiquant surement un haut niveau d'inflammation (Paul et al., 2020). L'utilisation de ce ratio sera discutée dans le chapitre 2, objectif 2, puisque nous l'avons évalué dans des modèles de l'exposome spatial.

Les monocytes présents dans le sang peuvent donner soit des macrophages soit des DC dans les tissus (Figure 18). Le nombre de monocytes est stable pendant un vol spatial court mais augmente lors d'un vol long (Buchheim et al., 2019; Crucian et al., 2011), il semblerait donc que l'effet des vols spatiaux sur leur nombre soit dépendant de la durée de la mission. De plus, des monocytes d'astronautes stimulés *in vitro* avec des LPS sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires pendant le vol, confirmant ainsi l'altération de la fonction monocyttaire (Crucian et al., 2011).

Les macrophages ont principalement des activités de phagocytose et de présentation antigénique. Il y en a de deux types : les M1 connus pour être pro-inflammatoires et les M2 connus pour être anti-inflammatoires, tous deux nécessaires à l'homéostasie des tissus (Figure 18). L'équipe de Shi a récemment montré que les vols spatiaux et la microgravité simulée réduisent de façon drastique la différenciation des CSH en macrophages et que les voies de signalisation permettant la polarisation vers le profil M1 ou M2 sont sévèrement altérées (Shi et al., 2021). La dérégulation de ces voies de signalisation compromet le bon développement, la fonction et la prolifération des macrophages. De plus, l'étude de la NASA menée sur des



jumeaux génétiquement identiques a mis en évidence une réduction progressive des progéniteurs de M1 et une augmentation progressive des progéniteurs de M2 au retour de mission comparé aux données avant vol (Garrett-Bakelman et al., 2019). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une altération des macrophages au niveau développement, fonction, polarisation et prolifération.

Les NK reconnaissent et tuent les cellules cancéreuses et les cellules infectées par des virus via une synapse immunologique et la libération de vésicules contenant des protéines cytotoxiques telles que les granzymes et la perforine (Figure 18). L'exposition à long terme de NK à la 0G a été évaluée dans des échantillons de sang d'astronautes, comparés à des échantillons contrôles au sol (1G). Dans l'ensemble, une diminution de la capacité cytotoxique des NK vis-à-vis de lignées cellulaires cibles a été observée. Il est intéressant de noter que la réduction de l'activité cytotoxique est apparue plus tôt chez les astronautes ayant été exposés plus longtemps au manque de gravité, ce qui indique une possible adaptation aux conditions de 0G (Bigley et al., 2019). Concernant les capacités de dégranulations des NK, les niveaux de granzymes B et perforines ont été évalués et aucun changement n'a été noté chez les astronautes (Bigley et al., 2019; Buravkova et al., 2004).

Les DC, quant à elles, lient le SI inné à l'adaptatif grâce à leur fonction de présentation antigénique aux LT (Figure 18). En microgravité simulée (s0G), la prolifération des cellules progénitrices de DC isolées à partir de sang humain est réduite ainsi que l'expression des marqueurs essentiels (CMH II et CD80) à la présentation antigénique (Savary et al., 2001). Dans le sang isolé d'un astronaute de la mission spatiale Eneide, les DC générées à l'aide de précurseurs monocytaires isolés ont présenté une réduction de l'expression en surface du CMH-II, de CD80 et de CD86, ce qui a été reflété par l'expression génique de ces marqueurs. De plus, l'expression du FdT NF- $\kappa$ B, important pour l'activation des DC, était sous-réglée indiquant un impact sur la maturation et l'expression des marqueurs de surface des DC (Monici et al., 2007).

### **3.2. Effets sur le système immunitaire adaptatif**

Les LT forment l'immunité adaptative cellulaire et ont des rôles directs dans la destruction des cellules infectées ou cancéreuses, dans la régulation de la réponse immunitaire via la production de cytokines et l'activation d'autres cellules du SI (Figure 18). L'équipe de Benjamin a montré une forte réduction de la lymphopoïèse T chez 16 astronautes à leur retour de mission (Benjamin et al., 2016). De plus, plusieurs études suggèrent que la fonction des LT serait impactée par les vols spatiaux. En effet, il a été montré que la formation de la synapse pourrait être altérée, celle-ci est essentielle à l'activation des LT qui va induire leur différenciation en sous-types (LTh, LTc, LTreg, LT mémoires). Cette étape nécessite un réarrangement du cytosquelette. Or une série d'études a montré que la structure du cytosquelette d'un grand nombre de différents types de cellules humaines et murines cultivés en s0G ou ayant volés est altéré (Hughes-Fulford,



2003; Ullrich and Thiel, 2012). L'altération du cytosquelette d'actine de cellules cancéreuses humaines Jurkat et FTC133 exposées à la s0G a également été démontré par imagerie de cellules vivantes à l'aide d'un microscope à fluorescence compact (FLUMIAS) (Corydon et al., 2016; Vogel et al., 2019). L'altération du cytosquelette a été confirmée au niveau du transcriptome puisque l'analyse de l'expression des gènes dans les LT de quatre donneurs humains à bord de l'ISS a permis d'identifier 99 gènes sous-régulés en microgravité. La majorité des gènes sous-régulés contenait des éléments de réponse au sérum de l'ADN (SRE) dans leur promoteur qui lient le facteur de réponse au sérum (SRF) qui sont des régulateurs directs des gènes du cytosquelette (Chang et al., 2012). Dans l'étude des jumeaux de la NASA, les LT avaient le plus grand nombre de gènes exprimés différemment, même après le retour sur Terre (Garrett-Bakelman et al., 2019). Au niveau cellulaire, la stimulation *in vitro* par des mitogènes de LT d'astronautes et de cosmonautes est réduite après un vol spatial tant au niveau de l'activation que de la prolifération (Ullrich and Thiel, 2012). Globalement, les LT présentent donc un changement dans l'expression des gènes, dans leur cytosquelette et de leur fonctionnement à l'échelle de la cellule (activation / prolifération).

Les LB, responsables de la réponse humorale, sont aussi impactés (Figure 18). En effet, l'analyse de fémurs de souris qui ont volé à bord du satellite BION-M1 durant 1 mois a révélé une réduction de nombreuses protéines nécessaires au bon développement osseux et immunitaire ainsi qu'une diminution de s LB dans la MO et dans la rate une semaine après l'atterrissage (Tascher et al., 2019). Une étude avec des amphibiens (pleurodèles) ayant volé a permis de mettre en évidence une augmentation de la transcription de la chaîne lourde IgM associée à une diminution de l'expression du FdTIKAROS, essentiel à la lymphopoïèse B suggérant un effet sur cette dernière (Fripiat, 2013; Huin-Schohn et al., 2013). Cependant, le nombre de LB chez l'Homme ne semble pas impacté par un voyage spatial de 6 mois (Buchheim et al., 2020; Spielmann et al., 2019a) ni par l'exposition à deux mois d'HDTBR (Bonnefoy et al., 2022). Des changements marginaux ont été observés dans les niveaux de biomarqueurs solubles de l'homéostasie B, à savoir les niveaux d'IgG et d'IgM dans le sang de 23 astronautes après 6 mois de vols spatiaux (Spielmann et al., 2019a). Par contre, des altérations importantes ont été observées au niveau des répertoires d'anticorps chez l'Homme mais peu chez la souris. En effet, l'analyse du répertoire d'Ig de souris ayant volé 21 à 22 jours à bord de l'ISS n'a pas révélé de différence significative (Ward et al., 2018). Cependant, notre laboratoire a montré que le répertoire IgM de deux cosmonautes sur cinq ayant séjourné 6 mois à bord de l'ISS était affecté (Buchheim et al., 2020). Ces modifications du répertoire IgM ont persisté jusqu'à 30 jours après l'atterrissage. Il est important de souligner ici la différence de temps d'exposition à la microgravité qui pourrait expliquer la différence de réponse, comme il l'a été observé dans d'autres types cellulaires du SI (cf. paragraphes précédents). Sachant que le répertoire d'anticorps est essentiel à la mise en place de la réponse des LB, la réponse de ces cellules en cas d'infection a été étudiée chez le modèle amphibien *Pleurodeles waltl*. Ceux-ci ont été immunisés pendant un vol spatial de longue durée (5 mois). Les analyses de ces animaux ont montré que la production d'anticorps ainsi que le taux d'hypermutations somatiques étaient affectés (Bascove et al., 2011, 2009; Boxio et al.,



2005). Toutes ces études indiquent que le répertoire de LB est modifié sous l'influence de l'exposome spatial lors des vols de longues durées et que ces modifications pourraient entraîner des conséquences dans la mise en place de la réponse immunitaire médiée par les LB.

Il est intéressant de noter que plusieurs études ont suggéré des similitudes entre les effets du vieillissement et les effets des vols spatiaux, c'est le concept de space-inflammaging. Ce concept suggère que les vols spatiaux provoqueraient un vieillissement accéléré de l'organisme (Campisi et al., 2024; Capri et al., 2023).

Malgré les nombreuses études menées à ce jour sur les effets de l'exposome spatial et des vols spatiaux en général, plusieurs points restent encore à étudier. Etant donné, les contraintes liées aux expériences spatiales, l'utilisation de modèles mimant une partie de l'exposome spatial s'avère nécessaire car ils permettent d'étudier les stress indépendamment ou des combinaisons différentes de stress.

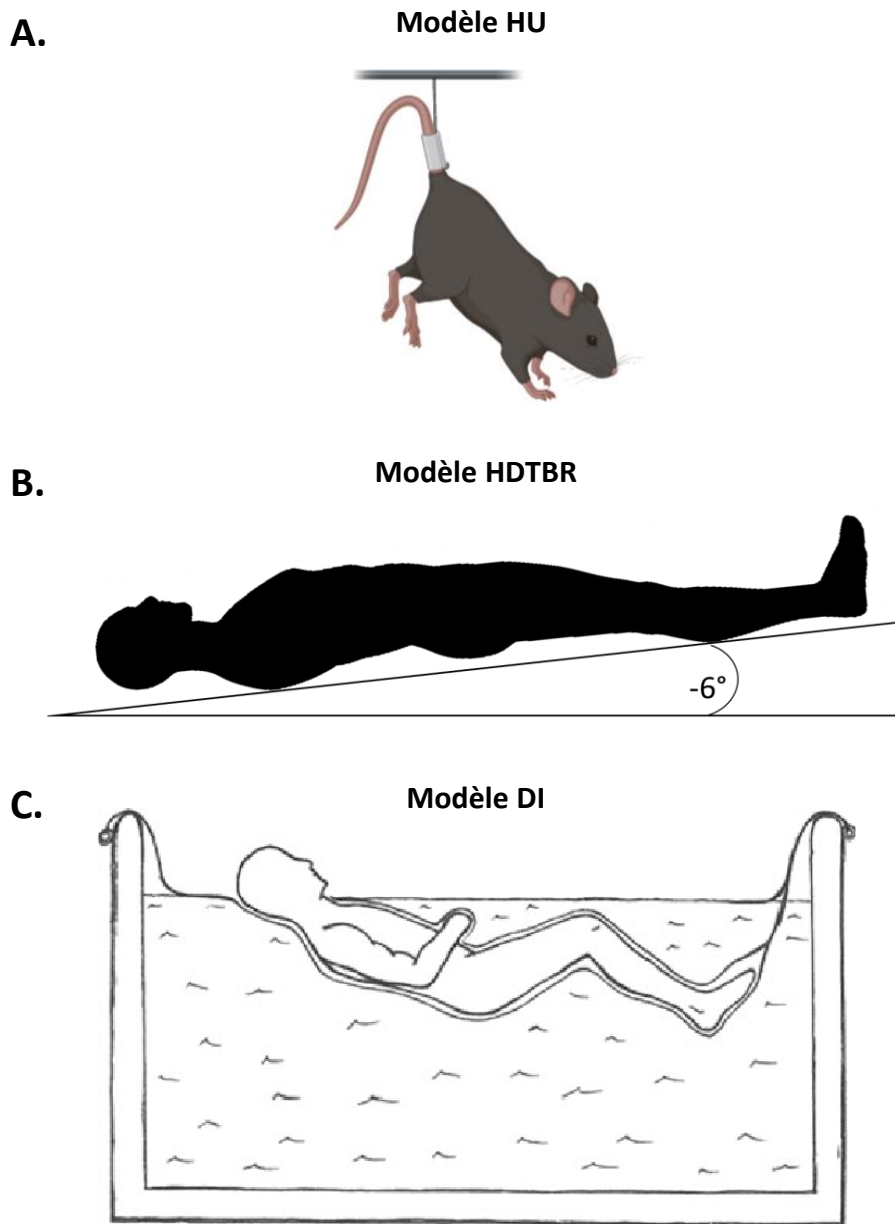
#### **IV. MODELES DE L'EXPOSOME SPATIAL**

Il existe de nombreux modèles permettant de reproduire certaines conditions de l'exposome spatial. Nous nous cantonnerons dans cette partie à certains modèles mimant la microgravité chronique sur des organismes complexes (souris et Hommes) ainsi qu'à certains modèles d'analogie de l'exposome spatial chez l'Homme et qui ne considèrent pas les changements gravitaires.

##### **1. Modèles d'étude la microgravité simulée sur des organismes complexes (souris et Homme)**

###### **1.1. Modèle murin d'hypokinésie des membres postérieurs (Hindlimb-Unloading)**

Le modèle murin d'hindlimb-unloading (HU), permettant de simuler la microgravité *in vivo* via l'hypokinésie des membres postérieurs (Figure 19A), est couramment utilisé car il examine les changements physiologiques dus à la sOG sur du court ou du long terme (Gao et al., 2024). Dans ce modèle, les membres postérieurs de la souris sont surélevés, seuls les membres antérieurs portent la masse corporelle (Morey-Holton and Globus, 2002). La souris est attachée par la queue selon un angle d'environ 30°. Le système d'attache permet d'une part que la queue et les membres postérieurs ne soient pas en contact avec le sol et ne portent pas la masse de l'animal et d'autre part à la souris de se déplacer dans sa cage via ses membres antérieurs. L'angle de 30°C est nécessaire car les membres antérieurs ne doivent porter que 50% de la masse totale de la souris. Une des limites de ce modèle concerne les membres antérieurs car ceux-ci ne sont pas soumis à la sOG (Guéguinou et al., 2009). Bien que ce modèle ne reproduise pas une réelle microgravité, il en reproduit une partie des effets comme la redistribution des fluides vers la tête ou encore une atrophie



**Figure 19 : Présentation des modèles de microgravité simulée.**

Il existe plusieurs modèles pour simuler la microgravité. Chez la souris, c'est l'hypokinésie des membres postérieurs ou hindlimb-unloading (modèle HU) (A). Chez l'Homme, il existe le head-down tilt bed-rest (HDTBR) (B), qui consiste en l'inclinaison du sujet en position couché à un angle de  $-6^\circ$ , et la dry-immersion (DI) (C) qui consiste en l'immersion du sujet en position couchée dans une baignoire recouverte d'une enveloppe protectrice.

musculaire et osseuse. L'utilisation de ce modèle permet d'évaluer les effets similaires à un vol spatial sur le long terme, en effet 6 mois de vol spatial correspond environ à 21 jours de HU pour une souris. Sa praticité tant dans la mise en place que dans la courte durée d'exposition lui donne un grand intérêt pour étudier les effets de la sOG et évaluer le retour à la normogravité après décharge de la souris ou tester la mise en place de contremesures. De façon intéressante, la facilité de mise en place du modèle HU permet l'évaluation de tous les systèmes physiologiques dont les conséquences sont souvent très similaires avec ce qui est observé chez les astronautes (Crucian et al., 2014). Il est aussi tout à fait faisable de le tester avec un autre type de stress comme les radiations (Wadhwa et al., 2024).

## 1.1. Modèles humains

S'il est impossible de reproduire la microgravité chez l'Homme, en revanche, il est possible d'en reproduire les effets grâce à différents modèles. Ici, les modèles introduits seront la dry-immersion, ou immersion sèche (DI), ou encore le head-down tilt bed-rest (HDTBR).

### 1.1.1. Dry-immersion

La dry-immersion (DI) est un modèle développé en Russie, où le sujet est placé dans une baignoire d'eau dont la température est comprise entre 32°C et 34,5°C sans être en contact direct avec l'eau (Crucian et al., 2014; Navasiolava et al., 2011; Tomilovskaya et al., 2019). Le sujet est immergé en position couchée à partir du cou (Figure 19C). Il est séparé de l'eau par un tissu waterproof qui enveloppe le corps entier de l'individu et le protège de l'eau. La DI est basée sur l'effet antigravitaire de l'eau, en d'autres termes ce modèle est basé sur le principe d'Archimède : un corps immergé dans un liquide ou un gaz est soumis à une force de flottaison vers le haut (force d'Archimède  $F_a$ ) égale au poids du liquide ou du gaz déplacé par le corps. La force de flottaison s'oppose à la gravité, réduisant ainsi le poids immergé dans l'eau (Saveko et al., 2023). Ce manque de support mécanique recrée les effets de l'apesanteur (0G) et induit des changements physiologiques dans tous les systèmes.

Ainsi, la DI provoque une inactivité physique importante résultant en une perte musculaire liée à une baisse de l'activité motrice et une redistribution des fluides dont les effets sont similaires à ceux observés chez les astronautes. Cependant, il existe plusieurs limites à ce modèle. En effet, lors de l'immersion, les forces de pressions sont distribuées de façon égales tout autour du corps sauf pour la tête et le cou qui eux ne sont pas supportés par l'eau (Navasiolava et al., 2011; Tomilovskaya et al., 2019). Il y a donc une redistribution des fluides mais qui ne touchent pas la tête ni le cou. Une autre limite est due au fait que le sujet doit quitter l'appareil pour des raisons hygiéniques (environ 3h par jour) ce qui a un impact sur l'étude et les effets



simulés (De Abreu et al., 2017). Les effets sont toutefois très rapides à observer puisqu'au bout de 5 jours, les effets sont grandement similaires aux effets spatiaux comme la perte musculosquelettique (Pandiarajan and Hargens, 2020).

### **1.1.2. Head down tilt Bed-rest**

Le modèle Head-Down Tilt Bed-Rest (HDTBR) est un autre modèle de sOG également très utilisé pour reproduire la OG depuis les années 60. Il consiste à placer un sujet en position couchée sur un lit incliné entre  $-4^{\circ}$  à  $-15^{\circ}$  (Saveko et al., 2023). L'angle de  $-6^{\circ}$  est couramment utilisé et est reconnu comme le standard international (Pandiarajan and Hargens, 2020) (Figure 19B). Cet analogue place donc un individu à  $-6^{\circ}$  pour que la tête soit plus basse que les pieds. Le sujet doit rester dans cette position durant toute la durée de l'expérimentation (en général au moins 1 mois). Il ne peut pas utiliser de coussins pour relever la tête ni de se relever même pour des courtes périodes (Hargens and Vico, 2016). Toutes les activités (médicales, hygiéniques et prise des repas) sont donc effectuées sans changement de position.

L'inclinaison du bed-rest redistribue la pression vers les membres inférieurs du corps plutôt que de la tête vers le bas du corps, recréant ainsi les effets de l'apesanteur. Globalement, même si cet analogue ne soustrait pas l'organisme aux effets de la gravité, il permet de recréer de nombreux effets de la OG comme la redistribution des fluides vers la tête, la perte musculosquelettique ou encore certains problèmes cognitifs similaires au syndrome neuro-oculaire associé aux vols spatiaux (Crucian et al., 2014; Pandiarajan and Hargens, 2020; Saveko et al., 2023).

## **1.2. Comparaison des différents modèles**

Chaque modèle de sOG présente des avantages et des inconvénients.

Concernant, le modèle HU, il est facile à mettre en œuvre, peu coûteux, moins long à mettre en place (tant au niveau administratif que dans la prise en charge des animaux), et il est possible de l'associer à d'autres stress comme les radiations ou des contre-mesures par exemple. Étant donné qu'il s'agit d'un modèle d'expérimentation animale, il y a plus de possibilités d'échantillonnages mais aussi de tests que sur des expérimentations humaines (comme récupérer de la MO impossible sur l'Homme pour une question d'éthique). De plus, la possibilité d'avoir un plus grand nombre d'individus permet une puissance statistique plus importante et la variabilité interindividuelle est réduite puisque les souris seront similaires génétiquement. Les souris sont aussi facilement manipulables et se reproduisent rapidement. Enfin, le modèle HU constitue un bon modèle pour analyser les effets ou tester des contre-mesures. Cependant, le HU ne recrée pas une sOG au niveau des pattes antérieures induisant un biais puisque l'entièreté de l'animal n'y

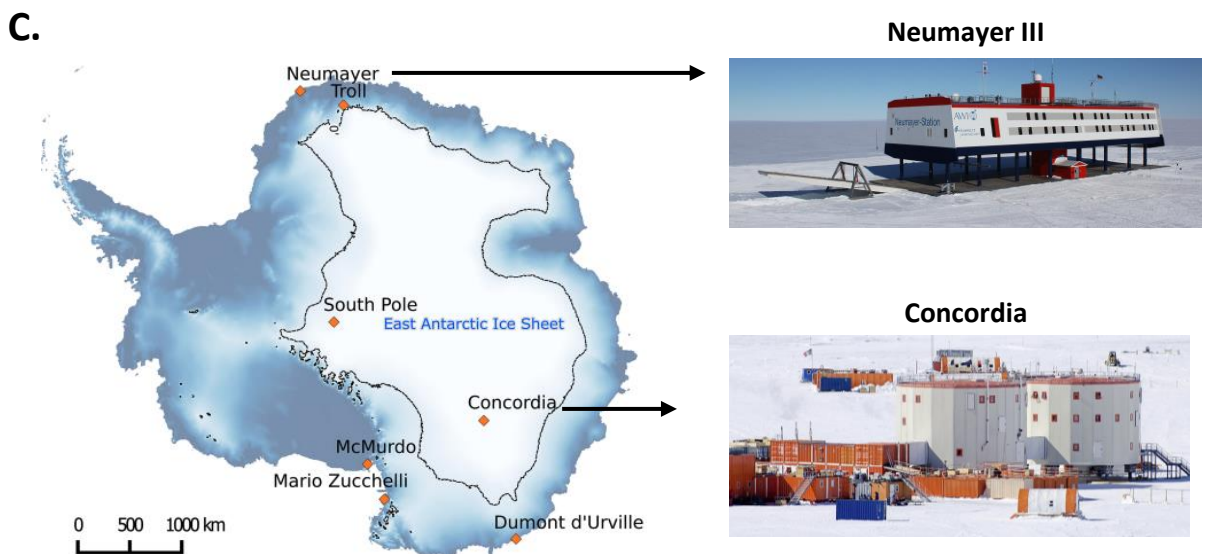
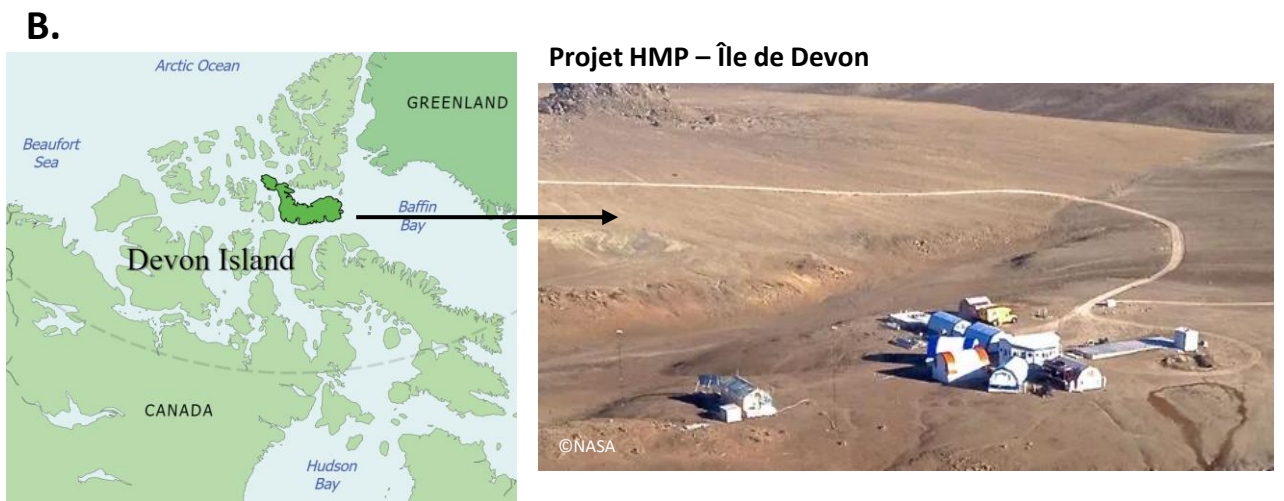
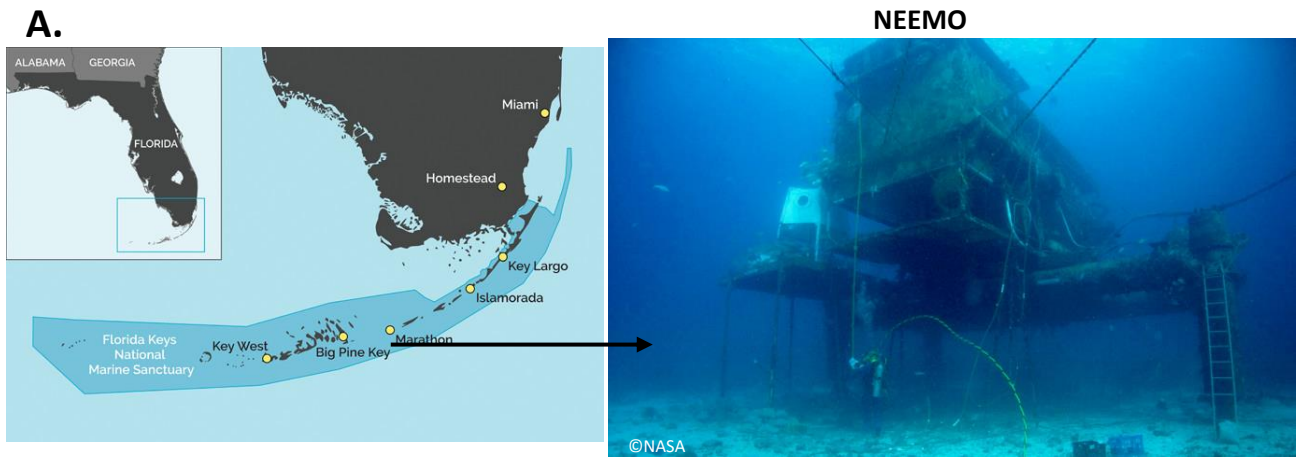


est pas soumise. De plus, il n'est pas garanti que les résultats obtenus chez la souris seront similaires à ceux trouvés chez l'Homme du fait de la différence d'espèce. Enfin, la plupart des études HU utilisent des souris mâles et excluent les souris femelles créant un biais de genre, limitant ainsi la quantité de données disponibles pour les femelles, alors que les études humaines tendent à incrémenter de plus en plus de femmes afin d'avoir une plus large représentation.

Concernant les études sur l'Homme, l'accent a été mis sur la DI et l'HDTBR, deux modèles couramment utilisés. Les deux se font sur femmes et hommes et possèdent des avantages et des inconvénients. Pour la DI, la redistribution des fluides est moins importante qu'avec l'HDTBR puisque le cou et la tête ne sont pas soumis à la sOG. Il faut aussi noter que lors d'une DI, il y a des sorties de baignoire pour des raisons hygiéniques ce qui n'est pas le cas pour l'HDTBR. En termes d'avantages, la DI est plus rapide pour observer les effets (5 jours contre 21 en HDTBR), elle permet l'étude du manque de support et les douleurs aux dos sont moins sévères comparés au HDTBR. La DI est moins coûteuse que l'HDTBR car sa durée est plus courte et ne nécessite donc pas un long séjour hospitalier. De plus, le rétablissement est plus rapide. Cependant, ce qui peut être considéré comme un inconvénient pour l'HDTBR n'en constitue pas moins un avantage. Les périodes pré et post HDTBR sont plus longues certes, mais cela permet la mise en place d'analyses plus longues et plus chronophages. Elle permet également d'espacer les paramètres évalués réduisant à la fois l'inconfort possible et l'impact potentiel des examens les uns sur les autres. Par exemple, une biopsie du muscle de la jambe aura potentiellement un impact sur les résultats d'évaluation de tests de performances sur quelques jours. De manière globale, ces deux modèles sont très intéressants et selon l'analyse faite l'un sera plus pertinent que l'autre. Par exemple, tester des contre-mesures semble plus approprié sur du bed-rest pour observer l'évolution avant, pendant, et après alors que la DI provoque des effets étudiables très rapidement et peut permettre une compréhension rapide des effets sur l'organisme.

## **2. Modèles d'analogues terrestres de l'exposome spatial chez l'Homme hors gravité**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'exposome spatial se compose d'une multitude de stress qui peuvent impacter tous les systèmes physiologiques. Dans cette partie, nous verrons les analogues de l'environnement spatial hors changements gravitaires qui présentent différentes combinaisons de stress puisqu'étudier les effets de différentes combinaisons permet de discriminer quel combinaison ou stress seul (dans ce cas par déduction en comparant différentes combinaisons) a tel effet sur l'organisme. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux modèles d'environnements extrêmes terrestres. A savoir qu'il existe aussi des modèles d'isolement extrêmes (Mars520, SIRIUS) fabriqués par l'Homme pour mimer la vie dans l'ISS mais que nous ne développerons pas ici. Nous nous concentrerons sur quatre modèles d'environnements extrêmes terrestres : NEEMO, Devon Island, Neumayer III et Concordia.



**Figure 20 : Localisation et présentation des environnements extrêmes terrestres servant d'analogues de l'exposome spatial.**

L'analogue NEEMO se situe au large de la Floride dans le sanctuaire marin national (A), le projet HMP se situe sur l'île de Devon sur le cercle Arctique (B). Neumayer III se situe sur la côte Antarctique tandis que Concordia se situe à l'intérieur du continent (C).

## 2.1. NEEMO

NEEMO pour NASA Extreme Environment Mission Operation est une base sous-marine localisée en Floride dans le sanctuaire marin national à une profondeur de 18 mètres (Figure 20A). C'est un laboratoire sous-marin (nommé Aquarius) qui peut être utilisé comme analogue spatial durant une quinzaine de jours généralement et jusqu'à un mois. La NASA conduit ses expérimentations en essayant au maximum de mimer la vie dans l'ISS. Le style de vie à bord d'Aquarius est similaire à celui de l'ISS. On y retrouve des espaces de vie réduits et clos en communauté restreinte (il s'agit d'un sous-marin), des stress liés aux missions grâce à l'organisation de sorties sous-marines de 6h à 9h ayant un but de recherche précis, ainsi que des expérimentations précieuses et coûteuses. A cela s'ajoute un dérèglement du cycle circadien car il n'est pas possible de suivre un cycle jour-nuit classique, une privation sensorielle due à la monotonie de la vie dans le sous-marin et l'isolement de l'équipe très similaire à ce qu'un astronaute vit (Tableau 6). De plus, les missions NEEMO consistent en de vraies déploiements/missions et présentent des risques associés liés à la plongée et à la profondeur. Les équipages sont souvent constitués d'astronautes permettant une comparaison directe des données biologiques obtenues par cet analogue avec les données biologiques des vols. La NASA appelle d'ailleurs les membres participants : les aquanautes.

## 2.2. L'île de Devon en Arctique

Un autre projet de la NASA, le NASA Haughton-Mars Project (HMP), se situe sur l'île de Devon au niveau de l'archipel Arctique canadien (Figure 20B). Cet analogue est localisé sur le cratère Haughton, le seul cratère localisé dans un désert polaire. Etant donné sa position proche du cercle arctique, c'est un environnement extrême et isolé car sans résidents permanents sur cette île. Les missions sur cette île durent 2 mois. Parmi les stress rencontrés, on trouve le stress lié à la mission car les individus sont sujets à un réel déploiement, ainsi que la peur de l'échec car les participants réalisent des tâches d'exploration sur le terrain qui sont des analogues directs de celles qui seront réalisées sur Mars ou sur la Lune (test de différentes technologies à visée exploratrice par exemple). Ce désert polaire correspond à un environnement extrême car il est fort venteux, rocheux (donc peu praticable), très peu végétalisé avec en été une exposition très importante aux UV. En plus de ces stress qui le font se placer dans la catégorie des analogues spatiaux, il est nécessaire d'ajouter les stress suivants: le voyage jusqu'à l'île de Devon est long et pénible, le rythme circadien est altéré à cause du phénomène de jour polaire (lumière totale en été), les infrastructures de vie et de recherche sont limitées (vie en communauté dans des espaces restreints avec peu de turnover des participants) et sont analogues à celles prévues sur la Lune où s'ajoutent une privation sensorielle et une privation nutritionnelle (Tableau 6). Les participants sont aussi isolés car seules les communications modernes leur permettent un accès vers l'extérieur.



## 2.3. Antarctique

L'Antarctique (Pôle Sud) est l'un des environnements les plus extrêmes et inhospitalier de la Terre, exempt de toute colonisation et civilisation. Afin de rendre-compte de l'extrême de cet environnement, il faut savoir que le 1<sup>er</sup> essai d'habitation humaine en Antarctique a été marqué d'une importante urgence psychiatrique qui a fortement menacé l'équipe et la bonne réussite de la mission (Stuster, 2000). Cela montre que les stress socio-environnementaux et physiques subit en Antarctique sont aussi sévères que ceux de l'exposome spatial (Palinkas et al., 2000; Salam, 2020). Il existe sur ce continent de nombreuses bases scientifiques situés sur le littoral ou à l'intérieur du continent dont la localisation diffère ainsi que leurs sévérités ; nous nous intéresserons aux stations Concordia et Neumayer III. Les individus participants à ces missions sont d'ailleurs nommés les terrestronautes.

### 2.3.1. Concordia

La station Concordia est une base scientifique franco-italienne situé à 3233 mètres d'altitude sur le plateau Antarctique du Dôme C à plus de 1000 km de la côte (Figure 20C). Elle fait partie des quelques stations qui se situent à l'intérieur du continent. Les missions, appelés hivernages durent en général 1 an avec une équipe de 13 à 15 personnes regroupant toutes les catégories socio-professionnelles, genres et nationalités. En effet, la station doit être capable de fonctionner avec ces seules personnes qui doivent donc assurer la bonne maintenance de la station pour pérenniser l'hivernage. L'environnement où se situe Concordia est considéré comme l'un des environnements les plus extrêmes sur Terre et très similaire à l'espace (Crucian et al., 2014; Van Ombergen et al., 2021). Concordia est d'ailleurs qualifié de « White Mars » (Crucian et al., 2014) du fait de ses températures, -80°C en hiver et -40°C en été accompagné de tempêtes, blizzards et rafales de vents. Les participants vont aussi subir de nombreux stress très similaires à ceux de l'exposome spatial. En effet, ils sont soumis à l'hypoxie (due à l'altitude), à de longues périodes de confinement et d'isolement extrêmes, à des privations sensorielles et nutritionnelles, à une vie en communauté réduite dans des habitats réduits et clos, à une altération du cycle circadien avec 6 mois de nuit polaire (obscurité totale) et 6 mois de jour polaire (lumière totale). A cela s'ajoute, la peur de l'échec car de nombreuses recherches scientifiques précieuses y sont menées, la possible défaillance du matériel pouvant compromettre leur survie et l'incapacité presque totale à sortir facilement de la station due à l'extrême climatique. Enfin, le voyage jusqu'à Concordia est difficile et long (jusque 2-3 semaines selon les conditions climatiques) et les missions de sauvetage et de réapprovisionnements sont impossibles pendant plus de 6 mois de l'année, lors de la période hivernale (Tableau 4). De manière anecdotique, il est plus simple de faire une mission de sauvetage vers l'ISS que de faire une mission de sauvetage vers Concordia qui est tout simplement impossible. Les télécommunications



sont également restreintes et la station n'est dotée d'internet que depuis 2008 mais il ne fonctionne pas toujours. Les participants sont dans des conditions semblables aux astronautes dans l'ISS pendant une période de temps similaire (9 mois), ils ressentent un réel sentiment de séparation de la vie humaine et terrestre. Cet environnement rend cet analogue particulièrement intéressant pour évaluer la combinaison de ces stress sur la physiologie humaine.

A noter, du fait de la similitude des stress rencontrés avec ceux de l'ISS, cette base sert de base d'entraînement pour les astronautes et est reconnue comme l'un des analogues les plus fidèles par l'ESA et la NASA (Crucian et al., 2014; Van Ombergen et al., 2021).

### **2.3.2. Neumayer III**

Neumayer III est une base scientifique allemande située sur le littoral antarctique (Figure 20C). De façon intéressante, l'environnement reste extrême mais d'un degré en-dessous de Concordia (Crucian et al., 2014). Les températures en hiver sont aux alentours de  $-60^{\circ}\text{C}$  et de  $-30^{\circ}\text{C}$  en été. Sa localisation costale la rend plus accessible mais l'environnement étant extrême, les possibilités de réapprovisionnement et de sauvetage sont tout de même fortement réduites. L'équipe qui participe aux hivernages y est pour une durée de 9 mois, de catégories socio-professionnelles et de nationalités différentes afin d'assurer la bonne maintenance de la station. Il est compté environ une quinzaine de participants qui sont soumis à différents stress physiques et socio-environnementaux. Parmi ces stress, il y a le confinement et l'isolement extrêmes, les privations sensorielles et nutritionnelles, une vie dans des habitats réduits et clos, la monotonie de la vie, une altération du cycle circadien avec 6 mois de nuit polaire (obscurité totale) et 6 mois de jour polaire (lumière totale). A cela s'ajoute, la peur de l'échec car de nombreuses recherches scientifiques y sont menées, la possible défaillance du matériel de la station et des restrictions de sorties (Tableau 6). De façon intéressante, Neumayer III est une base contrôle pour évaluer le stress hypoxique par rapport à Concordia car les stress rencontrés sont similaires entre les deux stations excepté pour le stress hypoxique, absent de Neumayer III (Crucian et al., 2014; Van Ombergen et al., 2021).

## **2.4. Comparaison des différents modèles : avantages et inconvénients**

Chaque modèle présente des avantages et des inconvénients (Tableau 6).

La base NEEMO n'est pas exposée aux UV contrairement aux autres modèles et n'est pas aussi extrême que Concordia en termes d'environnement de vie. Les missions NEEMO se déroulent sur des courtes périodes qui ne sont pas forcément représentatives des durées des missions spatiales créant un biais d'exposition et des conséquences observables. De ce fait, il est imaginable que plus un sujet est exposé à une telle combinaison de stress, plus les conséquences seront visibles et semblables à celles observées chez les astronautes. Par

	Espace	NEEMO	Île de Devon	Neumayer III	Concordia
Changements gravitaires	+++	/	/	/	/
Rayonnements ionisants	+++	/	+	/	/
Hypoxie hypobarique	++	/	/	/	++
Altération du rythme circadien	+++	++	++	++	++
Isolation extrême	+++	+	+	+++	+++
Confinement	+++	+	+	+++	+++
Peur de l'échec	+++	++	++	+++	+++
Peur de défaillances techniques	+++	+	+	++	+++
Privation sensorielle	+++	++	++	+++	+++
Privation nutritionnelle	+	+	++	+++	+++
Durée d'exposition	6 mois – 1 an	14 jours	2 mois	9 mois	9 mois

**Tableau 6 : Similarités et différences entre l'espace et les analogues d'environnements extrêmes terrestres.**

Les similarités et différences de stressors ainsi que la durée d'exposition entre l'espace, NEEMO, l'île de Devon, les stations Antarctique Neumayer III et Concordia sont présentées dans le tableau ci-dessus.

/ indique que le stress n'est pas présent.

+ indique la présence du stress et le nombre de + indique degré de sévérité.

rapport à l'ISS, plusieurs points sont communs mais leurs différences en font des modèles très différents. Bien que NEEMO lui ressemble, il ne reproduit qu'une certaine combinaison de stress réduite. Cependant, l'analogue NEEMO est intéressant car la plupart des participants sont des astronautes permettant ainsi une comparaison directe car les individus auront subis les mêmes entraînements, ce qui constitue le réel intérêt de ce modèle.

Le modèle de l'Île de Devon propose une exposition plus longue que NEEMO et possède un réel intérêt dans l'exploration de l'espace lointain (notamment Mars). Son environnement de cratère fait de lui un modèle de choix pour les tests d'instruments d'exploration, leurs mises en place et les maintenances par l'équipe de participants qui doit faire avec ce qu'elle a. De plus, il constitue un modèle intéressant pour étudier les effets de forts rayonnements UV sur l'organisme contrairement aux autres modèles. Néanmoins, le temps d'exposition n'est pas similaire à celui d'un astronaute et, étant donné l'évaluation des technologies d'exploration, les individus sont moins confinés et ont une plus grande liberté comparativement aux autres modèles et à l'ISS. L'environnement, bien que considéré comme extrême l'est moins que dans les stations Antarctique ou à bord de l'ISS.

Les missions en Antarctique sont plus longues et de fait plus similaires à celles de l'ISS, ce qui en fait des modèles particulièrement intéressants. Tout en Antarctique est plus extrême, parfois presque autant ou pire que dans l'ISS, en faisant un analogue particulièrement pertinent. De plus, la station Concordia évalue le stress hypoxique et présente des confinements et isolements bien plus forts que les autres analogues et qui sont plus semblable à l'ISS. Le fait que cette station soit soumise à des détériorations de matériel et de fonctionnements plausibles renforce les peurs de l'échec et de défaillances techniques connues par les astronautes. De façon intéressante, Neumayer III présente les mêmes stress mais d'un niveau légèrement inférieur et est un contrôle normoxique permettant de discriminer les conséquences de l'hypoxie que les astronautes rencontrent à bord de l'ISS et à Concordia. Neumayer III et Concordia présentent aussi des privations sensorielles plus fortes, ainsi que des privations nutritionnelles plus importantes car l'hivernage dure 9 mois sans réapprovisionnement possible pendant cette période. Ces modèles exacerbent fortement les stress chroniques subis. De plus, l'équipe étant composée d'individus très différents cela permet une compréhension des conséquences de l'exposition à des stress sociaux sur la physiologie humaine, applicables dans le domaine spatial et dans celui de la santé publique où la compréhension de l'impact des stress est un point majeur d'intérêt.

Tous ces modèles permettent finalement l'exposition à des stress chroniques chez l'Homme plus ou moins similaires à ce que rencontre un astronaute. Il semblerait néanmoins que l'un des modèles les plus fidèles soit la station Concordia.



## V. PROBLEMATIQUES

La préparation des futures missions lunaires et martiennes est l'une des priorités de la plupart des Agences Spatiales. L'étude des conséquences de l'exposition aux vols spatiaux est donc d'une importance capitale. A ce jour, il est connu que l'exposome spatial a un effet globalement délétère sur le SI favorisant l'apparition de potentielles pathologies et pouvant fortement compromettre le système de défense des astronautes et des futurs voyageurs spatiaux. Beaucoup d'études ont été réalisées sur le système immunitaire innée ou se sont concentrées sur l'immunité adaptative à médiation cellulaire. De fait, peu d'études approfondies sur l'immunité humorale existent et sa compréhension dans le contexte spatial reste floue et peu explorée. Ce manque de données sur cette immunité doit être comblé car l'immunité humorale est essentielle à une protection optimale de l'hôte et son altération provoque de nombreuses conséquences négatives. Dans ce contexte, il est également essentiel de pouvoir monitorer le statut immunitaire et de santé des astronautes. Cependant les possibilités de diagnostics lors d'un vol spatial sont limitées, il est donc essentiel d'identifier des biomarqueurs faciles d'utilisation et de compréhension.

Ma thèse s'est donc divisée en 2 axes principaux. Je me suis, d'une part, intéressée à l'impact des stress rencontrés lors des vols spatiaux sur l'immunité humorale et plus particulièrement sur les répertoires d'anticorps. Et d'autre part, je me suis attachée à identifier des biomarqueurs d'intérêt pour le monitoring du statut immunitaire et du statut de santé des voyageurs spatiaux.

### **1. Objectif 1 : Etude de l'impact de différentes combinaisons de stress rencontrés lors de vols spatiaux sur les répertoires BCR murin et humain**

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'exposome spatial est une combinaison de stress très variés. L'étude précédemment menée au laboratoire sur du sang d'astronautes a mis en évidence l'impact de ces stress sur les répertoires d'anticorps. Cependant, dans ce type d'étude il n'est pas possible de déterminer quel(s) type(s) de stress est(sont) le(s) plus impactant pour le SI et plus particulièrement pour le répertoire d'anticorps. Dans le but d'identifier l'impact des différents stress sur ce paramètre, nous avons utilisé trois modèles différents : le modèle murin HU pour étudier l'impact de la microgravité, les modèles d'hivernages (modèle Humain) à Neumayer III et à Concordia pour étudier l'impact de différentes combinaisons de stress sans la microgravité.

#### **1.1. Etude de l'impact de la microgravité sur le répertoire BCR murin**



Peu d'études ont été menées sur les effets de l'exposome spatial sur le développement des lymphocytes B et le répertoire de BCR. Une étude menée au laboratoire sur des embryons de pleurodèle soumis à des changements gravitaires a mis en évidence des diminutions des niveaux de transcription d'Ikaros, un FdT essentiel au développement des LB suggérant un impact des changements gravitaires sur la lymphopoïèse B (Fripiat, 2013). Cette hypothèse a par la suite été confirmée par Lescale et collaborateurs sur le modèle murin HU (Lescale et al., 2015). Les résultats obtenus ont de plus présenté de nombreuses similarités avec le vieillissement comme une diminution des populations pro-B, pré-B et des B immatures. De façon intéressante, ces stades sont ceux où se déroulent la recombinaison V(D)J et la sélection du BCR, suggérant que le répertoire de BCR pourrait être modifié dans les deux cas.

Suite à ces résultats, nous avons donc cherché à déterminer si l'hypokinésie des membres postérieurs (et donc la microgravité simulée) pouvait modifier le répertoire de BCR et si des modifications similaires avaient lieu lors du vieillissement. Dans ce but, nous avons comparé les effets du modèle HU à ceux du vieillissement sur les effecteurs de la recombinaison V(D)J et sur la diversité du répertoire BCR.

## **1.2. Etude de l'effet d'environnements extrêmes sur le répertoire BCR humain**

Comme nous l'avons vu précédemment, une étude pilote longitudinale menée au laboratoire a mis en évidence des changements significatifs du répertoire IgM pour 2 cosmonautes sur 5 associés à une plus forte réponse au stress et à des changements d'activité des effecteurs de la recombinaison V(D)J (Buchheim et al., 2020). Ces modifications ont d'ailleurs persisté jusqu'à 30 jours après le retour de mission. Ces résultats suggèrent une modification de la capacité de reconnaissance de l'antigène par les anticorps et une modification de la machinerie enzymatique de recombinaison V(D)J induite par les vols spatiaux de longues durées. Cependant, la multitude des stress rencontrés dans ces conditions rend impossible l'évaluation de l'impact de différents stress sur l'immunité humorale. Afin de déterminer quelle combinaison de stress chroniques impactent le plus le répertoire BCR et la recombinaison V(D)J et de quelle manière, nous nous sommes intéressés à des modèles de stress chroniques analogues de l'exposome spatial : un séjour dans les bases Antarctique Neumayer III et Concordia lors des études CHOICE. De fait, nous avons étudié les effets de différentes combinaisons de stress sur la recombinaison V(D)J et le répertoire BCR. De plus, la comparaison des données obtenues pour chacun des deux modèles nous a permis de discriminer les effets des stress rencontrés dans ces deux bases.

Il est à noter que l'augmentation constante des stress chroniques dans notre société, indiquent qu'il est nécessaire de caractériser les effets de ces stress sur le répertoire BCR chez l'Homme.



## **2. Objectif 2 : Utilisation des biomarqueurs NLR, GLR et PLR pour évaluer le statut immunitaire et de santé dans différents modèles d'études**

L'identification de biomarqueurs facilement déterminables en vol est d'une importance capitale puisque des missions spatiales de longues durées sont prévues à l'avenir et la possibilité de diagnostic en vol reste très limitée. Une étude préliminaire réalisée sur 23 astronautes ayant passé 6 mois à bord de l'ISS et sur des souris soumises à 14 ou 30 jours d'hypokinésie des membres postérieurs, a mis en évidence l'intérêt du ratio neutrophiles sur lymphocytes (NLR) et granulocytes sur lymphocytes (GLR) comme biomarqueurs du statut immunitaire, très facile à mettre en œuvre et peu onéreux (Paul et al., 2020). Nous avons donc voulu confirmer l'intérêt de ces biomarqueurs et étudier la pertinence d'un autre biomarqueur : le ratio plaquettes sur lymphocytes (PLR). Ces études ont été réalisées sur deux modèles humains d'analogue de la microgravité : le head-down tilt bed-rest et la dry-immersion.

### **2.1. Intérêt des ratios NLR, GLR et PLR dans un modèle de microgravité simulée, le head-down tilt bed-rest**

Comme nous l'avons dit précédemment, l'identification de biomarqueurs est indispensable pour les futures missions spatiales de longues durées. A ce jour, le ratio NLR semble être un bon candidat pour monitorer le statut immunitaire des voyageurs spatiaux comme présenté par Paul et collaborateurs. Dans la continuité de cette étude, nous avons évalué l'intérêt de ces biomarqueurs dans un analogue de la microgravité, le head-down tilt bed-rest lors du bed-rest Cocktail de 8 semaines. Cette étude a permis de confirmer l'intérêt des ratios NLR, GLR et d'identifier le ratio PLR comme un bon candidat pour le monitoring du statut immunitaire et de santé. De plus, nous avons pu évaluer le rétablissement de ces ratios après la fin du bed-rest.

### **2.2. Confirmation de l'intérêt des ratios NLR, GLR et PLR pour le monitoring du statut de santé des astronautes dans un modèle de microgravité simulée, la dry-immersion**

Comme indiqué ci-dessus, les biomarqueurs NLR, GLR et PLR semblent d'excellents candidats pour monitorer le statut de santé des astronautes. Afin de s'en assurer, nous avons étudié ces biomarqueurs sur un autre modèle de microgravité simulée : la dry-immersion lors des études Vivaldi 1 et 2. Les études Vivaldi 1 et 2 étant réalisées sur hommes et femmes, cela nous a donné la possibilité d'étudier ces biomarqueurs en fonction du genre. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que ces ratios sont associés positivement à un stress physique et corrélés avec des marqueurs de stress, d'inflammation et des facteurs cardio-vasculaires qui diffèrent entre hommes et femmes.



## CHAPITRE II : RESULTATS

### Objectif 1 : Etude de l'impact de différentes combinaisons de stress rencontrés lors de vols spatiaux sur les répertoires BCR murin et humain

#### I. Etude de l'impact de la microgravité sur le répertoire BCR murin

La dérégulation du système immunitaire par l'exposome spatial, associée à des soins limités, représente un risque pour les futures missions spatiales. En effet, il a été montré que 46% des astronautes séjournant 6 mois à bord de l'ISS présentent des problèmes immunologiques qui se traduisent notamment par des réactivations virales (Crucian et al., 2016). Comme décrit dans l'introduction, l'immunité humorale est peu étudiée dans le contexte spatial (Jacob et al., 2023). Certaines études suggèrent un impact de l'exposome spatial sur l'immunité humorale tandis que d'autres, portant sur les effets de vols spatiaux ou d'analogues de la microgravité comme le modèle head-down tilt bed-rest, ne révèlent pas de changements importants de l'homéostasie des lymphocytes B (Bonnefoy et al., 2022; Spielmann et al., 2019b). Concernant le répertoire anticorps, peu d'éléments sont à ce jour connus sur l'effet des vols spatiaux. Une étude menée au laboratoire a mis en évidence des modifications significatives du répertoire d'IgM chez 2 cosmonautes sur 5 qui ont persisté jusque 30 jours après leur retour de mission (Buchheim et al., 2020). De façon intéressante, une autre étude a montré une réduction de la diversité des anticorps murins à la suite d'un vol spatial et une modification du répertoire d'anticorps après vaccination dans le cas de souris soumise au modèle HU (analogue de la microgravité) (Rettig et al., 2021, 2019). Ces résultats suggèrent que l'exposome spatial et surtout que le stress gravitaire pourrait avoir un impact sur le répertoire d'anticorps et sa diversité essentielle à la bonne protection de l'hôte. De plus, différentes études utilisant la microgravité ou des modèles de microgravité simulée ont mis en évidence une diminution de la lymphopoïèse B chez la souris (modèle HU et souris ayant volé à bord du satellite BION-M1) et l'amphibien (larves de pleurodèles s'étant développées dans l'ISS) (Huin-Schohn et al., 2013; Lescale et al., 2015; Tascher et al., 2019). Chez des souris soumises à 21 jours de HU, la diminution des populations cellulaires pro et pré-B est similaire à celle observé chez des souris âgées. Etant donnée la diminution des cellules pro et pré-B qui sont les stades où a lieu la recombinaison V(D)J, responsable en partie de la diversité du répertoire d'anticorps, nous nous sommes demandé si le HU, un analogue de la microgravité, impacterait le répertoire d'IgM et la recombinaison V(D)J de la même manière que le vieillissement. Dans cette étude, l'objectif était donc de déterminer le degré de similarité entre les changements du répertoire d'IgM et de la recombinaison V(D)J chez des souris soumises au stress microgravitaire par le modèle HU et chez de souris âgées et ainsi déterminer l'impact du stress microgravitaire sur le répertoire d'Ac. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que des souris soumises à 21



jours de HU présentait des changements dans leur répertoire IgM qui étaient similaires au répertoire des souris âgées mais l'effet du vieillissement était plus sévère. Nous avons aussi mis en évidence que le changement d'utilisation des segments antigéniques détectés chez les souris HU n'était pas dû à un changement de la recombinaison V(D)J.



## Article I:

Hindlimb unloading, a physiological model of microgravity, modifies the murine bone marrow IgM repertoire in a similar manner as aging but less strongly

Coralie Fonte, Pauline Jacob, Anne Vanet, Stephanie Ghislin and Jean-Pol Fripiat

*Immunity & ageing : I & A* vol. 20,1 64. 20 Nov. 2023



RESEARCH

Open Access



# Hindlimb unloading, a physiological model of microgravity, modifies the murine bone marrow IgM repertoire in a similar manner as aging but less strongly

Coralie Fonte<sup>1</sup>, Pauline Jacob<sup>1</sup>, Anne Vanet<sup>2</sup>, Stéphanie Ghislin<sup>1</sup> and Jean-Pol Fripiat<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background** The spaceflight environment is an extreme environment that affects the immune system of approximately 50% of astronauts. With planned long-duration missions, such as the deployment of the Lunar Gateway and possible interplanetary missions, it is mandatory to determine how all components of the immune system are affected, which will allow the establishment of countermeasures to preserve astronaut health. However, despite being an important component of the immune system, antibody-mediated humoral immunity has rarely been investigated in the context of the effects of the space environment. It has previously been demonstrated that 30 days aboard the BION-M1 satellite and 21 days of hindlimb unloading (HU), a model classically used to mimic the effects of microgravity, decrease murine B lymphopoiesis. Furthermore, modifications in B lymphopoiesis reported in young mice subjected to 21 days of HU were shown to be similar to those observed in aged mice (18–22 months). Since the primary antibody repertoire composed of IgM is created by V(D) J recombination during B lymphopoiesis, the objective of this study was to assess the degree of similarity between changes in the bone marrow IgM repertoire and in the V(D)J recombination process in 2.5-month-old mice subjected to 21 days of HU and aged (18 months) mice.

**Results** We found that in 21 days, HU induced changes in the IgM repertoire that were approximately 3-fold less than those in aged mice, which is a rapid effect. Bone remodeling and epigenetics likely mediate these changes. Indeed, we previously demonstrated a significant decrease in tibial morphometric parameters from day 6 of HU and a progressive reduction in these parameters until day 21 of HU, and it has been shown that age and microgravity induce epigenetic changes.

**Conclusion** These data reveal novel immune changes that are akin to advanced aging and underline the importance of studying the effects of spaceflight on antibody-mediated humoral immunity.

**Keywords** Antibody, Spaceflight, Humoral immunity, Stress, Immune system, B lymphopoiesis, V(D)J recombination, Aging

## Background

Spaceflight-induced immune system dysregulation, coupled with limited clinical care, represents a clinical risk to crewmembers in future deep-space missions. Indeed, a study of medical data collected from 46 astronauts who spent six months on the International Space Station (ISS)

\*Correspondence:

Jean-Pol Fripiat  
jean-pol.fripiat@univ-lorraine.fr

<sup>1</sup> Stress Immunity Pathogens Laboratory, UR 7300 SIMPA, Faculty of Medicine, Lorraine University, Vandoeuvre-lès, Nancy, France

<sup>2</sup> Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75013 Paris, France



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



showed that 46% of them encountered immunological problems such as hypersensitivities and infections [1].

However, despite being an important component of the immune system, antibody-mediated humoral immunity has rarely been investigated in the context of the effects of the space environment. Some studies have suggested that humoral immunity might be affected during a space mission, even though spaceflight and a ground-based analog of spaceflight (6° head-down tilt bed rest) did not have a major impact on human B-cell homeostasis [2, 3]. Indeed, it was recently shown that the IgM repertoire of two out of five analyzed cosmonauts was significantly modified during and after a prolonged mission on the ISS [4]. Another recent study suggested a trend toward reduced murine antibody binding site diversity as a result of spaceflight [5]. Other studies revealed that hindlimb unloading (HU), a physiological model of microgravity [6], affects the murine antibody repertoire after vaccination [7, 8]. Similarly, it was shown that a 5-month spaceflight affects amphibian antibody production in response to antigen stimulation [9–11] and reduces the frequency of somatic hypermutation that diversifies antibody binding sites to improve their affinity for the antigen [12].

The creation of a diverse antibody repertoire, which is essential for effective host protection, requires the V(D)J recombination process that takes place during B lymphopoiesis in adult bone marrow. V(D)J recombination associates antibody gene segments to create antibody genes. For example, to create a heavy-chain gene, it associates a variable (IGHV), a diversity (IGHD) and a joining (IGHJ) gene segment. This recombination is mediated by several effectors. The recombination-activating gene 1 and 2 (RAG1/2) proteins interact with recombination signal sequences (RSSs) situated in the 3' region of IGHV, on both sides of IGHD and in the 5' region of IGHJ segments and cause DNA breaks between coding IGHV, IGHD or IGHJ segments and the non-coding RSS, leading to the formation of hairpin-sealed coding ends [13]. Then, the Artemis protein complex opens hairpin loops, eventually creating palindromic sequences corresponding to short inverted repeats of the segment terminal sequence [14], and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) adds nontemplated nucleotides to coding ends. This is followed by hybridization of single-stranded DNA on a few nucleotides, removal of overhangs, and ligation. The end product is the third complementarity-determining region (CDR3) of heavy chains, which is a highly variable region harboring many of the antigen binding sites.

Interestingly, it was demonstrated using larvae of the amphibian *P. waltl* that developed on the ISS [15], mice subjected to 21 days of HU [16], and mice that

spent 30 days aboard the BION-M1 satellite [17] that B lymphopoiesis is decreased in real and simulated microgravity. Furthermore, Lescale et al. [16] showed that 21 days of HU led to a decrease in murine B lymphopoiesis that was markedly similar to that observed in aged (18–22 months) mice. These authors showed that, as in aged mice, HU induced a decrease in pro-B and pre-B cells. Furthermore, they found that this decrease was associated with impaired IL-7 signaling in murine pro-B cells, as previously reported in aged mice [18].

Given that the assembly of antibody heavy-chain gene segments by V(D)J recombination occurs at the pro-B stage [19] and that IL-7 signaling profoundly influences IGHV segment selection during V-to-DJ recombination [20], we wondered whether HU would affect the murine bone marrow IgM repertoire and V(D)J recombination in the same manner as aging. The objective of this study was therefore to assess the degree of similarity between changes in the bone marrow IgM repertoire and in the V(D)J recombination process in HU and aged mice. Our results reveal that 21 days of HU and aging altered the bone marrow IgM repertoire in a similar manner, but the effect of aging was stronger. They also show that changes in the use of antibody gene segments in mice subjected to 21 days of HU could not be attributed to a change in the V(D)J recombination process or to a stress response.

## Results

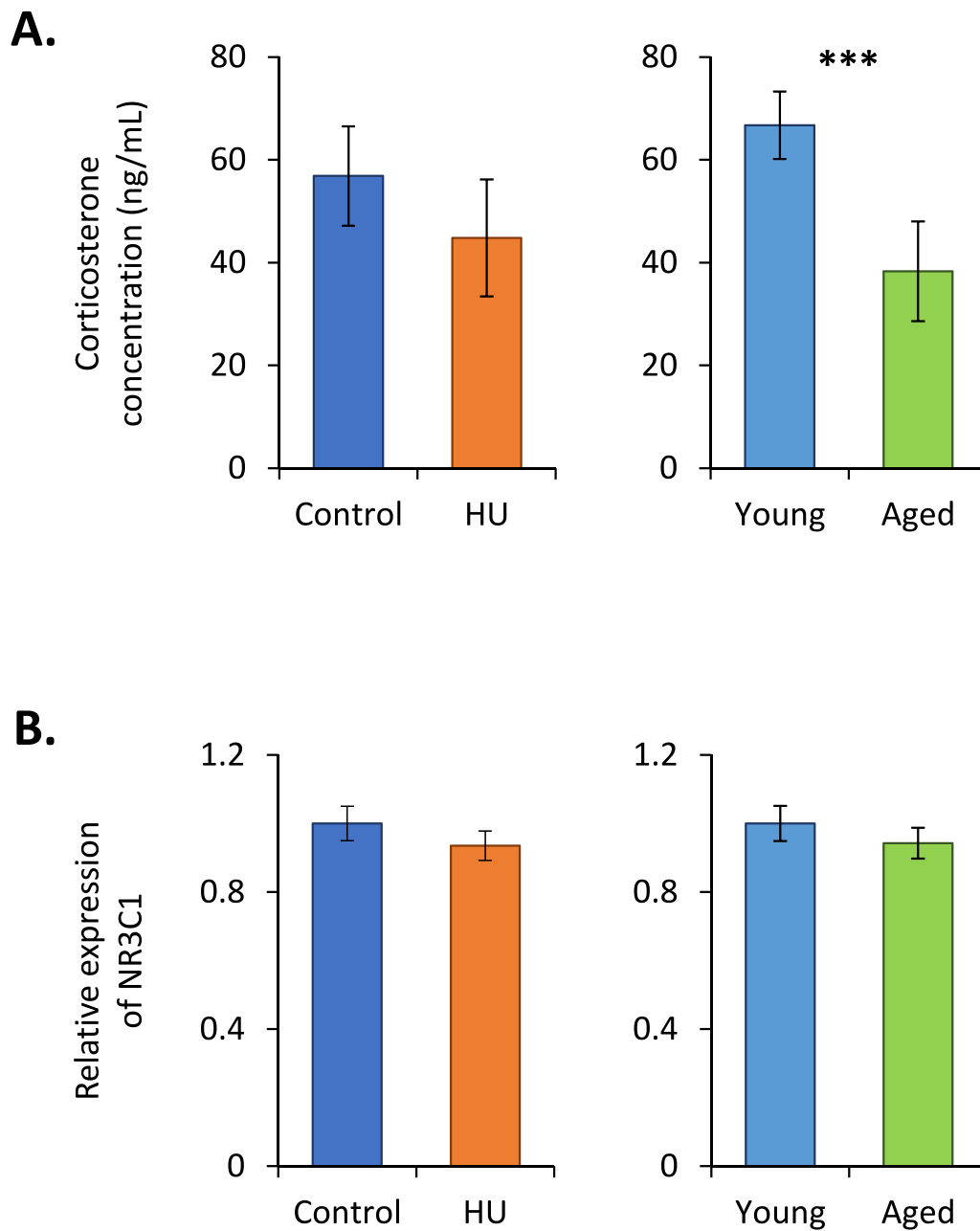
### Evaluation of stress in aged and HU mice

To evaluate the stress response, we quantified serum corticosterone, the major stress hormone in rodents, and glucocorticoid receptor (NR3C1) transcripts in the bone marrow because circulating and locally produced glucocorticoids can impact lymphopoiesis [21]. No difference in corticosterone concentration between control and HU mice was observed (Fig. 1A), as previously reported after 3 weeks of HU [16, 22]. There was a significant decrease in corticosterone concentration in aged mice, but the corticosterone concentrations remained close to those observed in unstressed mice (approximately 50 ng/mL, according to the literature). Figure 1B shows that there was no significant change in the relative expression of NR3C1 mRNAs in HU and aged mice. Taken together, these results suggest that our four groups of mice were nonsignificantly stressed, if at all.

### Impact of aging and HU on pro-B and pre-B cells

The impact of aging and HU on pro-B and pre-B cells was determined by flow cytometry. Significant decreases in both subpopulations were noted in both groups (Fig. 2).





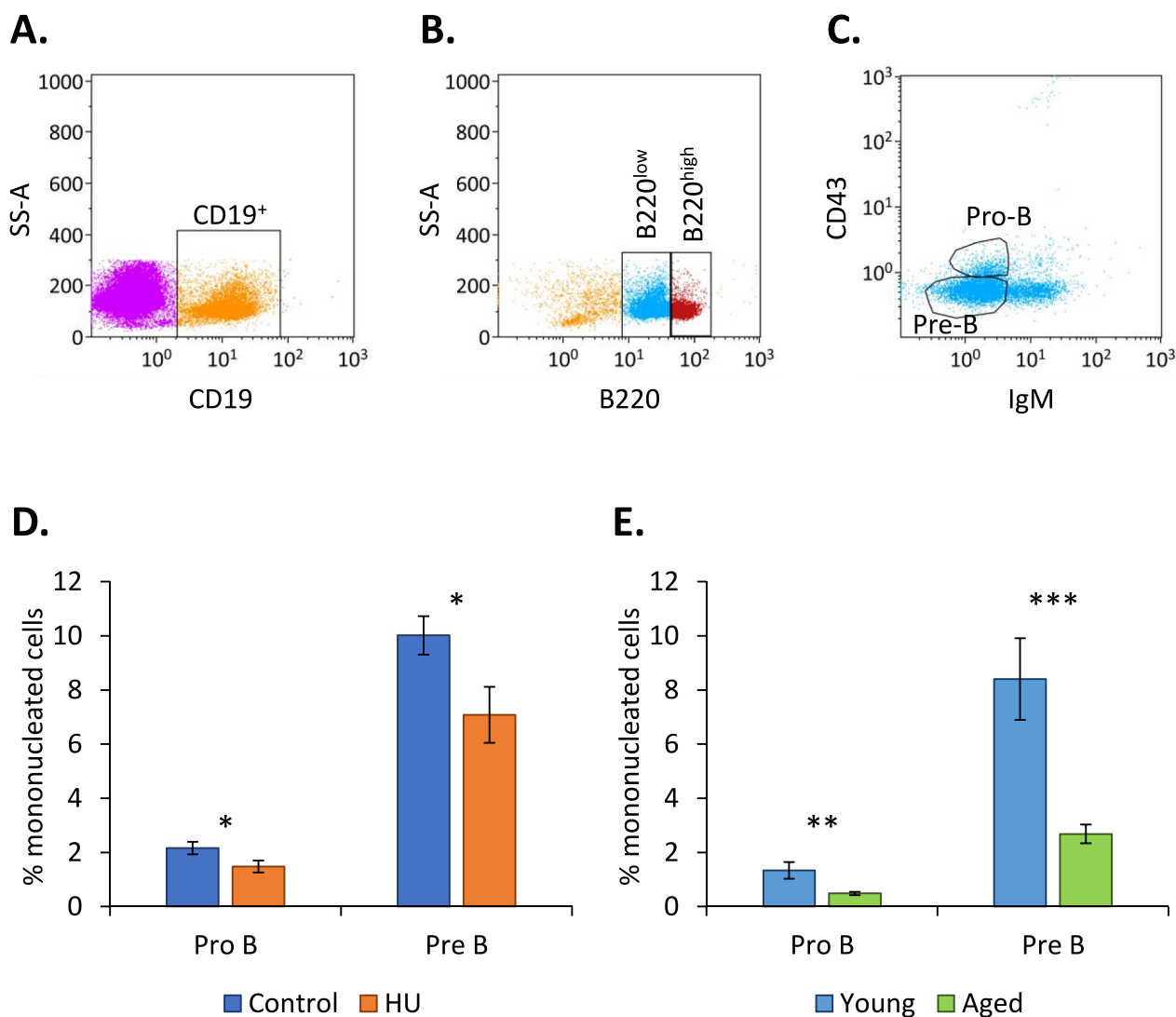
**Fig. 1** Evaluation of stress in HU and aged mice. **A** Corticosterone concentrations in sera, determined by ELISA, in control vs. HU ( $n = 10$  in each group) and young vs. aged mice ( $n = 19$  in each group). **B** Quantification, by quantitative real-time PCR, of NR3C1 mRNAs in the bone marrow of control vs. HU ( $n = 24$  in each group) and young vs. aged mice ( $n = 27$  in each group). This transcript encodes the glucocorticoid receptor. mRNA levels were normalized to those of 3 housekeeping transcripts. The relative value obtained with controls or young mice was set to 1. Data are shown as the means  $\pm$  SDs. Statistically significant differences were found using Mann–Whitney or unpaired t tests. \*\*\* $p \leq 0.001$

These results are consistent with the findings of the study by Lescale et al. [16], thereby validating our HU procedure and confirming that this treatment induces a decrease in the abundance of pro-B and pre-B cells. We also noted that pro-B and pre-B cells were more strongly affected by aging than by HU.

**Effects of aging and HU on the repertoire of IgM heavy chains**

To investigate how HU and aging affect the IgM repertoire, we constructed libraries of IgM heavy-chain cDNAs from the bone marrow of HU and aged mice and from the bone marrow of corresponding 3.5-month-old





**Fig. 2** Quantification of pro-B and pre-B cells in the bone marrow of HU and aged mice. **A, B, C** Gates designed to identify pro-B and pre-B cells. These cells were identified based on the expression of the following markers: pro-B (CD19<sup>+</sup>/B220<sup>low</sup>/CD43<sup>+</sup>/IgM<sup>-</sup>) and pre-B (CD19<sup>+</sup>/B220<sup>low</sup>/CD43<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>). **A** Selection of CD19<sup>+</sup> lymphocytes from viable bone marrow cells. **B** Among CD19<sup>+</sup> lymphocytes, cells could be divided into B220 high and B220 low populations. **C** In the B220 low population, depending on the expression of CD43 and IgM, the pro-B (CD43<sup>+</sup>/IgM<sup>-</sup>) and pre-B (CD43<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>) populations could be distinguished. **D, E** Frequencies of pro-B and pre-B cells in the bone marrow of control ( $n = 14$ ) vs. HU ( $n = 13$ ) (**D**) and young ( $n = 13$ ) vs. aged ( $n = 13$ ) (**E**) mice. Data are shown as the means  $\pm$  SDs. Statistically significant differences were found using Mann-Whitney or unpaired t tests. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$

controls (Control and Young groups). These libraries were subjected to high-throughput sequencing. Only functional sequences with unique CDR3s, the most diverse part of Ig transcripts, were retained to eliminate potential PCR biases and clonal expansions. We obtained 10,406 to 27,241 unique sequences per sample, of which 16–18% were nonfunctional. These nonfunctional sequences were not further considered, as the purpose of this study was to determine the impact of aging and HU on the expressed IgM repertoire. We also assessed the efficiency

of the strategy used to create our libraries by determining the number of functional IGHV gene segments in our datasets. The International Immunogenetics Information System (IMGT) predicts 125 functional IGHV gene segments in the murine immunoglobulin heavy chain locus (*IGH*) located on chromosome 12 [23]. Additional file 1 shows that 130 functional IGHV gene segments were detected in our datasets. We are therefore confident that our libraries provide an accurate picture of IGH rearrangements. This is supported by previous studies that



have shown that detected IGHV gene segments assessed without amplification parallel the repertoires reported using more focused amplification methods [24, 25].

To determine how aging and HU affect the IgM repertoire, dispersion indexes (DIs) were calculated. These indexes vary from 0 (no diversity) to 1 (greatest diversity). Because the two independent HU experiments and the study of aged mice could not be performed simultaneously, several 3.5-month-old control groups had to be used. Thus, we first checked the stability of the bone marrow IgM heavy chain repertoire in these control groups. The lack of significant difference in DIs for the use of IGHV, IGJ, and IGHD segments (Additional file 2), the similarity in CDR3 lengths (Additional file 3A), and the similar amino acid composition of CDR3s of 11 to 14 aa (Additional file 3B), except the 13 aa CDR3s for which a small statistically significant difference in DI of  $0.02 \pm 0.01$  (mean  $\pm$  SD) was noted, indicates the stability of the bone marrow IgM heavy-chain repertoire in the 3.5-month-old C57BL/6J control groups. Then, we compared DIs for unique VDJ associations in the bone marrow of control vs. HU and young vs. aged mice. Figure 3A shows that the IgM repertoire of HU and aged mice was different from that of the corresponding 3.5-month-old controls. We also studied the usage of IGHV, IGHD and IGJ segments. Figure 3B shows that the use of IGHV segments was modified in HU and aged mice, but with greater modification in aged mice (difference in DI of  $0.06 \pm 0.024$  (mean  $\pm$  SD) in HU mice and difference in DI of  $0.16 \pm 0.04$  in aged mice versus the corresponding 3.5-month-old controls), while the use of IGHD segments (Fig. 3C) was modified only in aged mice, and no statistically significant modification of IGJ segment usage was found in either group (Fig. 3D). Taken together, these data show that aging and HU modify the IgM repertoire in the bone marrow, that these modifications are mainly due to changes in the use of IGHV segments and that, within 21 days, HU induces changes in the IgM repertoire that are approximately 3-fold less than those in aged mice, which is a rapid effect.

#### **IGHV segment usage according to their position in the murine *IGH* locus**

An important parameter in the choice of IGHV segments during V(D)J recombination is the location of the segment on the locus, which is subdivided into 3 zones (from 5' to 3': distal, median, and proximal) (Fig. 4A) [26, 27]. Of the 130 functional IGHV segments detected in our libraries, 62% belonged to the distal zone, 26% belonged to the median zone, and 12% were part of the proximal zone. These distal, middle and proximal functional IGHV segments were present in 44–48%, 43–50% and 6–9% of the unique VDJ associations found in our libraries,

respectively (Fig. 4B). This observation confirms a bias in the use of IGHV segments during V(D)J recombination. Consequently, we investigated the effects of aging and HU on IGHV segment usage based on the zones that these segments belonged to. Figure 4C shows that the use of distal IGHV segments was modified in HU and aged mice. Modification of median IGHV segment usage was noted in aged but not in HU mice (Fig. 4D), while there was no difference in proximal IGHV usage (Fig. 4E). These data suggest that the changes in IGHV segment usage in HU mice depicted in Fig. 3B mainly resulted from changes in the use of distal IGHV segments, while changes in IGHV segment usage in aged mice were due to changes in the use of IGHV segments belonging to the distal and median zones of the murine *IGH* locus.

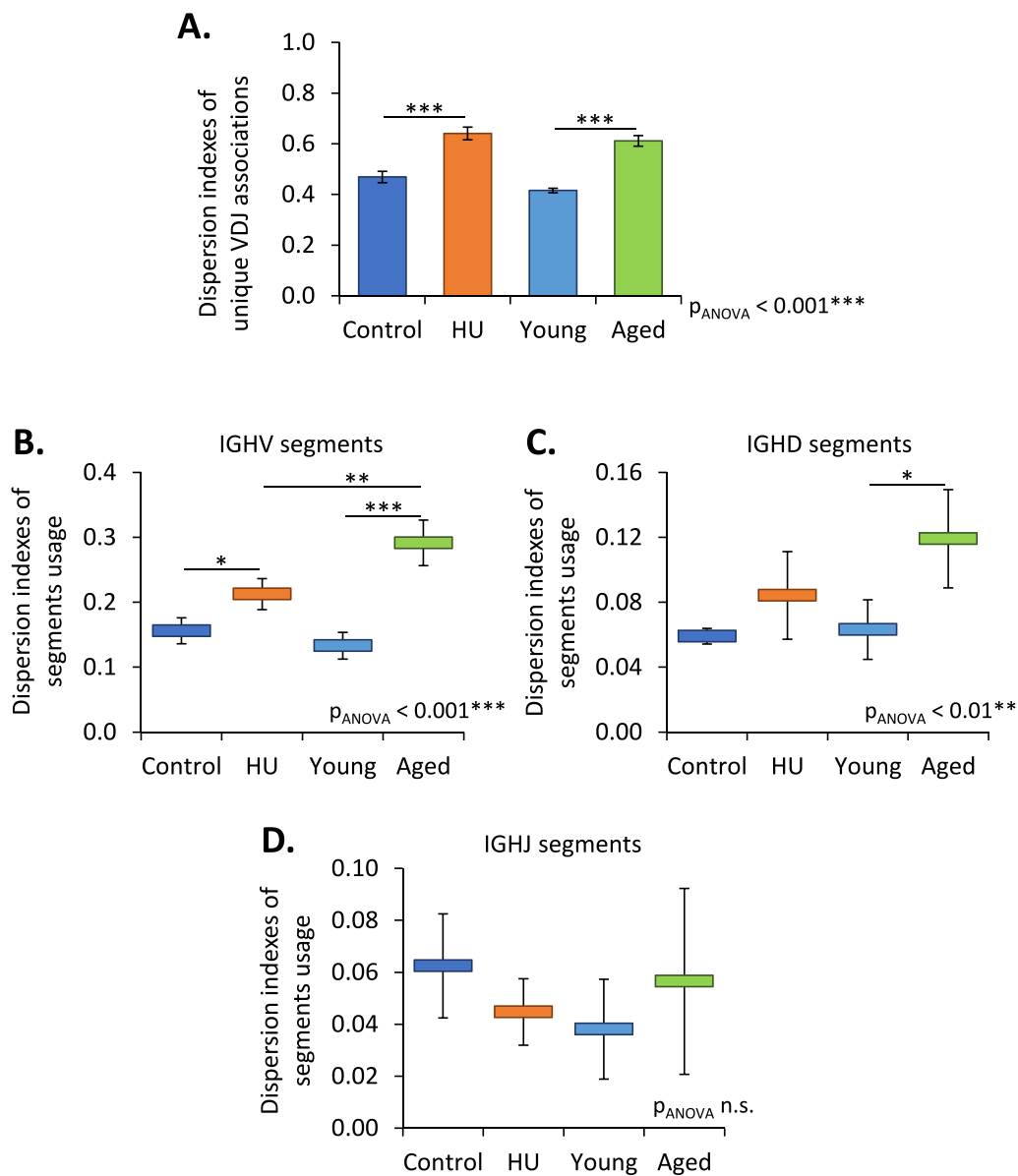
#### **Potential impact on immunity**

To assess the consequences of changes in IGHV and IGHD segment usage on the antigen recognition capabilities of IgM from HU and aged mice, we studied CDR3 length (Fig. 5A and B) as well as the amino acid (aa) composition of the most frequent CDR3s (Fig. 5C and D). Indeed, the heavy-chain CDR3 is a major contributor to the antibody binding site because it encodes the longest and most variable loop composing this site. Figure 5A shows that HU mice did not present significant variation in CDR3 length, except for 21-aa CDR3s, which are rare. However, in aged mice (Fig. 5B), there was a significant decrease in the frequency of sequences with a CDR3 of 7, 8, 9, 11, and 18 aa and a significant increase in the frequency of sequences with a CDR3 of 14 and 20 aa. These data suggest an increase in CDR3 length with age, as previously observed by others [28]. In addition to CDR3 length, we analyzed the aa composition of the most frequent CDR3s (11 to 14 aa). Figure 5C and D show that changes in the amino acid composition of these CDR3s occurred in both HU and aged mice, suggesting that IgM binding site specificities are likely affected in these two groups of mice.

#### **Effects on V(D)J recombination**

To try to understand in the reasons underlying the changes in IGHV and IGHD usage, we studied the effects of HU and aging on V(D)J recombination. We first quantified RAG1, TdT and Artemis mRNAs in the bone marrow of mice from the different groups in this study. Figure 6 shows that the relative expression of transcripts encoding two of these three major effectors of V(D)J recombination, RAG1 and TdT, was significantly reduced in aged but not in HU mice. Then, we studied imprints left in IgM heavy-chain transcripts by RAG1/2, Artemis and TdT during the V(D)J recombination process. When the RAG1/2 complex cuts DNA



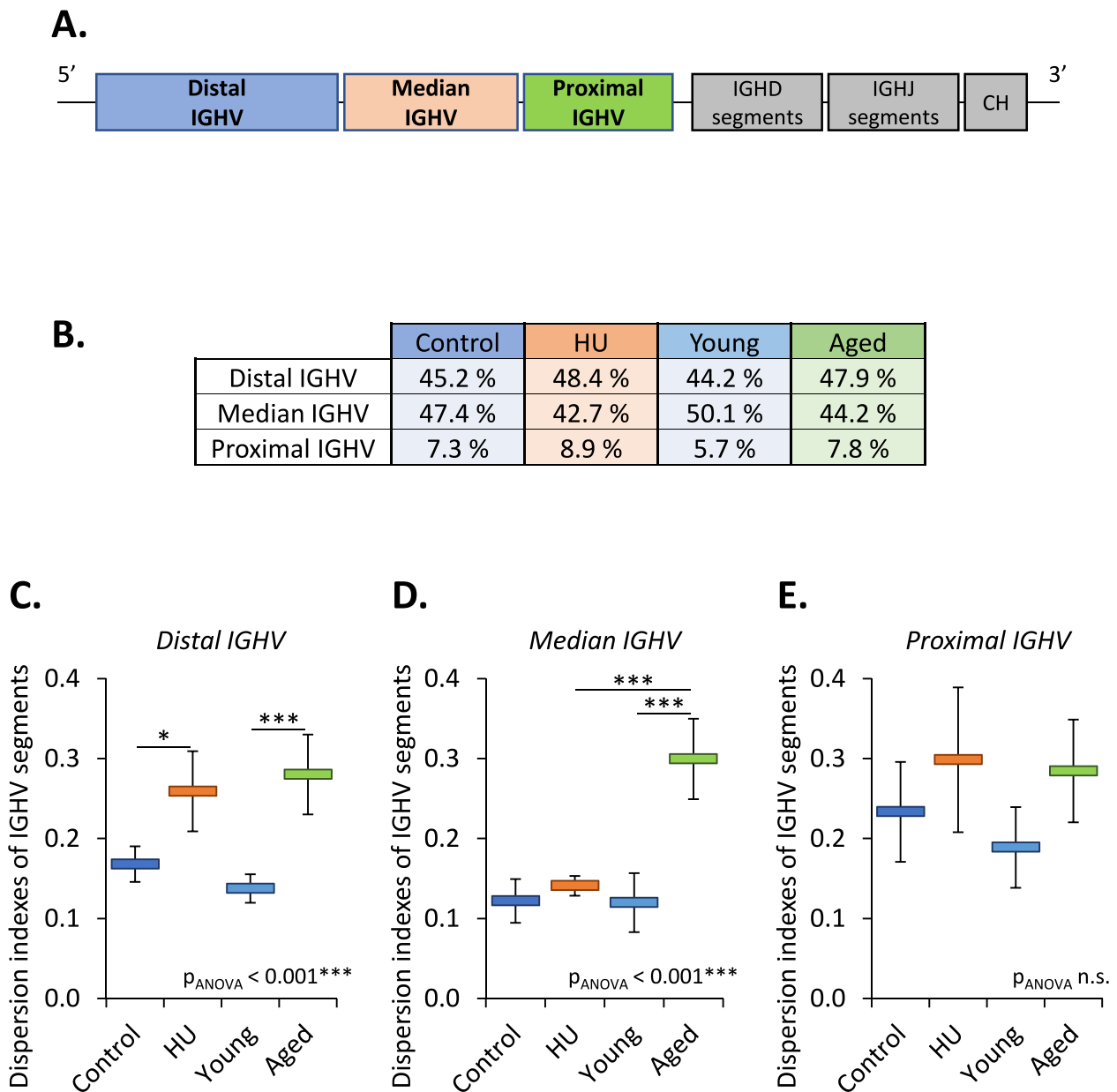


**Fig. 3** The IgM repertoire of HU and aged mice was different from that of the corresponding 3.5-month-old controls. **A** Dispersion indexes for unique VDJ associations in the bone marrow of control vs. HU and young vs. aged mice. **B, C, D** Dispersion indexes for IGHV (**B**), IGHD (**C**) and IGHJ (**D**) segment usage in the bone marrow of control vs. HU mice and young vs. aged mice. Data are shown as the means  $\pm$  SDs of 4 groups, each comprising 5 mice ( $N=4, n=5$ ). Statistically significant differences were found using one-way ANOVA followed by a Tukey–Kramer post hoc test. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; n.s., nonsignificant

during V(D)J recombination, some nucleotides (nt) can be deleted at the 3' end of IGHV, on both sides of IGHD and at the 5' end of IGHJ segments [29]. Thus, we studied the trimmed IGHV and IGHJ segments as well as IGHD length. Figure 7A, B and C show that these three signatures were not significantly affected in HU mice. However, one of them (IGHD length) was affected in aged mice. We also determined the frequencies of sequences according to the length of IGHD

segments. Figure 7D shows that except in sequences containing IGHD segments of 13 nucleotides, there was no difference between the HU group and the corresponding controls. In contrast, aged mice showed a significant decrease in the number of sequences with an IGHD segment of 4 to 9 nucleotides and a significant increase in the number of sequences with an IGHD segment of 14 and 16 nucleotides (Fig. 7E). This suggests that with aging, the RAG1/2 complex removes



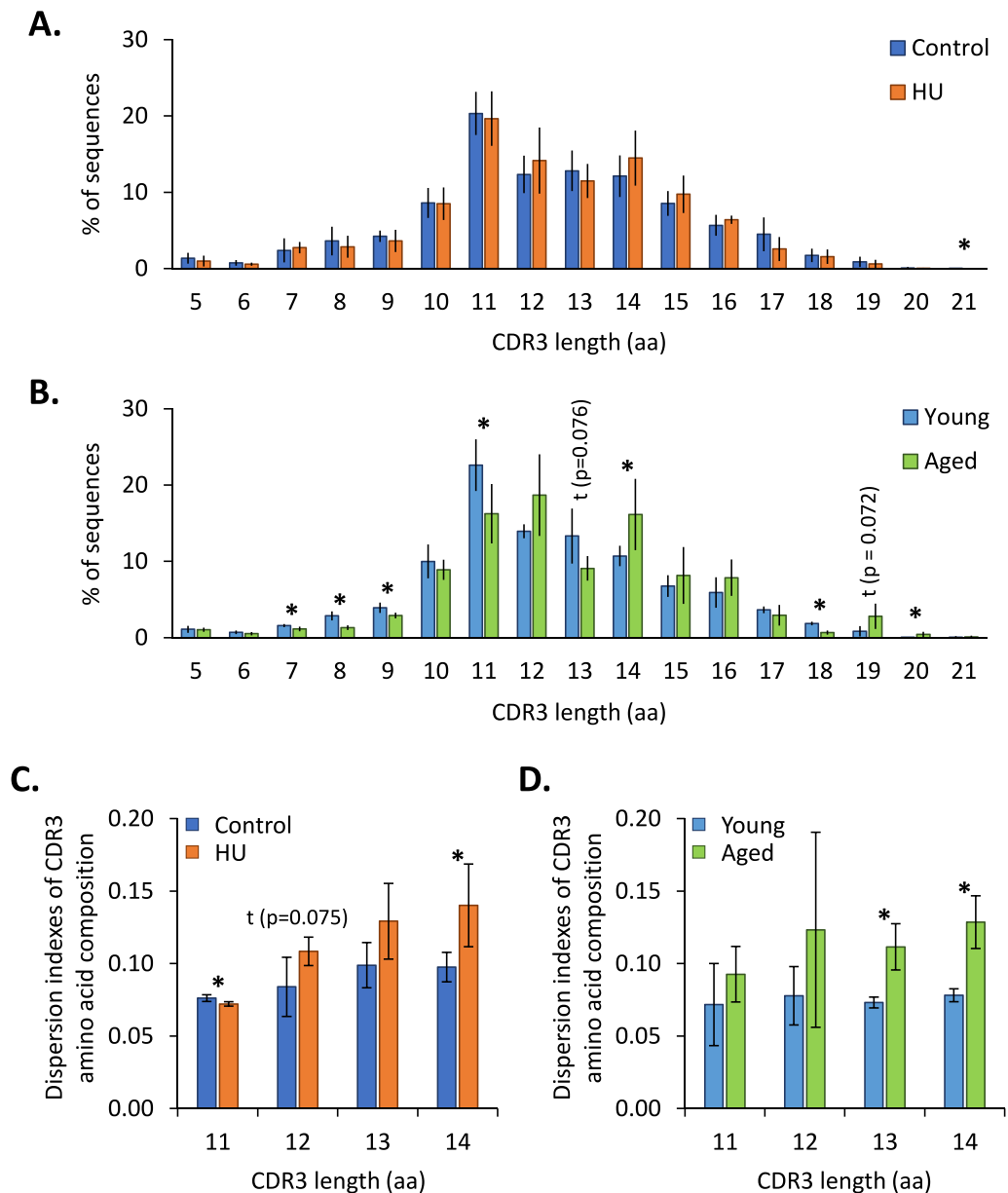


**Fig. 4** IGHV segment usage according to their location on the murine *IGH* locus. **A** Schematic presentation of distal, median and proximal IGHV segments on the murine *IGH* locus. **B** Percentage of IGHV segments belonging to the distal, median and proximal areas in our four groups of mice. **C, D, E** Dispersion indexes for distal (**C**), median (**D**), and proximal (**E**) IGHV segment usage in control vs. HU and young vs. aged mice. Data are shown as the means  $\pm$  SDs of 4 groups, each comprising 5 mice ( $N=4, n=5$ ). Statistically significant differences were found using one-way ANOVA followed by a Tukey–Kramer post hoc test. \* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; n.s., nonsignificant

fewer nucleotides at the ends of IGHD segments. We also analyzed palindromes created by Artemis during V(D)J recombination. The percentage of sequences without or with palindromes at IGHV-IGHD junctions was not affected by aging or HU (Fig. 8A). However, a significant increase in the frequencies of sequences with palindromes at IGHD-IGHJ junctions was

observed in aged but not in HU mice, thereby indicating that the action of Artemis could be modified by aging. Finally, we examined nongenomic nucleotides added by TdT (Fig. 8B) and noted that aged mice presented an increase in the percentage of sequences with  $\geq 7$  added nucleotides, while no change was noted in HU mice. The action of TdT is therefore also likely





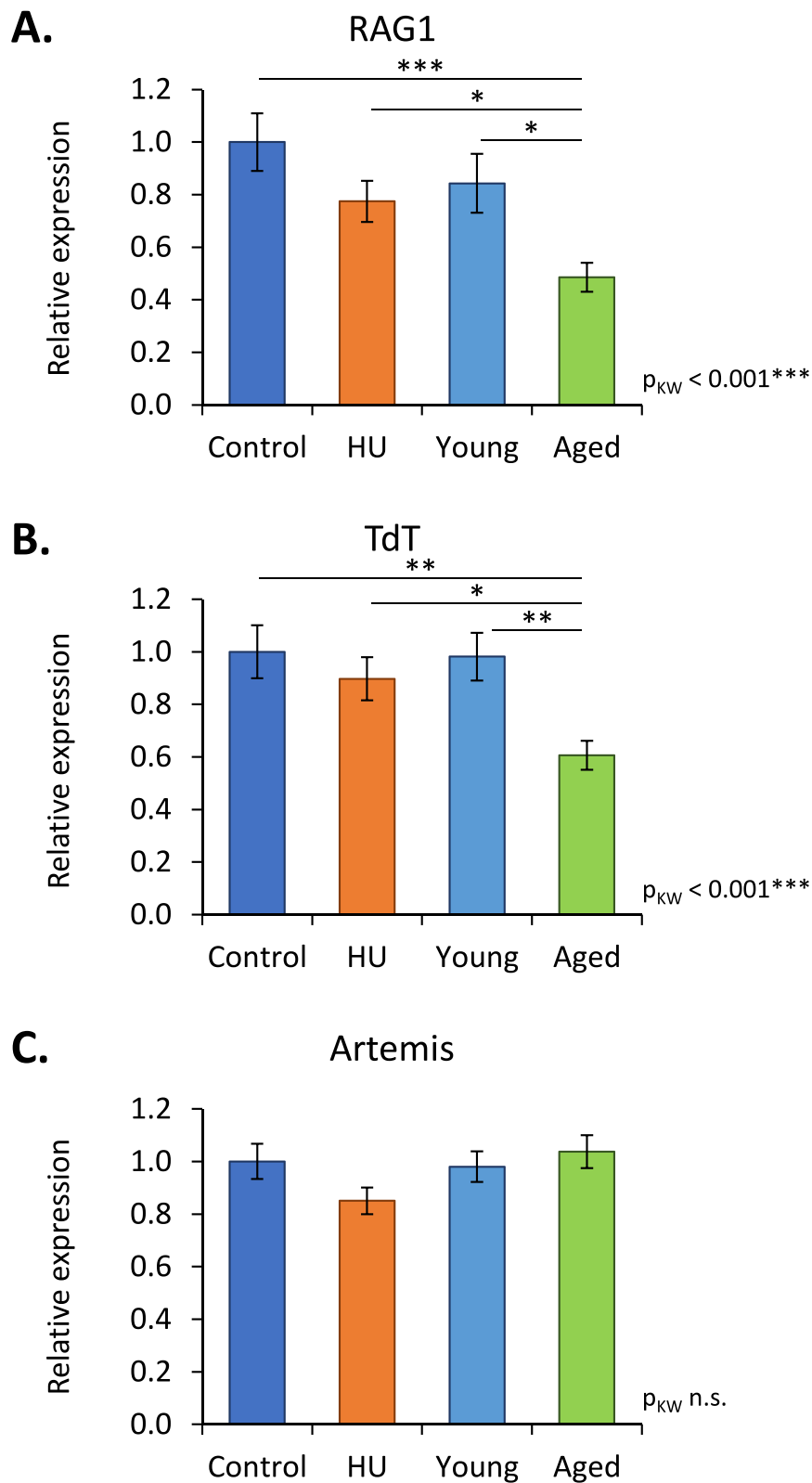
**Fig. 5** Impact of HU and aging on heavy-chain CDR3s. **A, B** Frequencies of sequences according to CDR3 length in control vs. HU (**A**) and young vs. aged (**B**) mice. **C, D** Analyses of the amino acid composition of the most frequent CDR3s (11 to 14 amino acids) in control vs. HU (**C**) and young vs. aged (**D**) mice. Dispersion indexes for CDR3 amino acid composition in HU and aged mice were compared to the corresponding controls aged 3.5 months. Data are shown as the means  $\pm$  SDs of 4 groups, each comprising 5 mice ( $N=4$ ,  $n=5$ ). Statistically significant differences were found using Mann–Whitney or unpaired t tests. \* $p \leq 0.05$ ; t indicates a trend

affected by aging but not by HU. Taken together, these results indicate that the V(D)J recombination process is unlikely to be affected by 21 days of HU, while it is likely affected by aging. Thus, changes in IGHV usage observed in mice subjected to 21 days of HU (Fig. 3B) cannot be attributed to a change in the V(D)J recombination process.

### Discussion

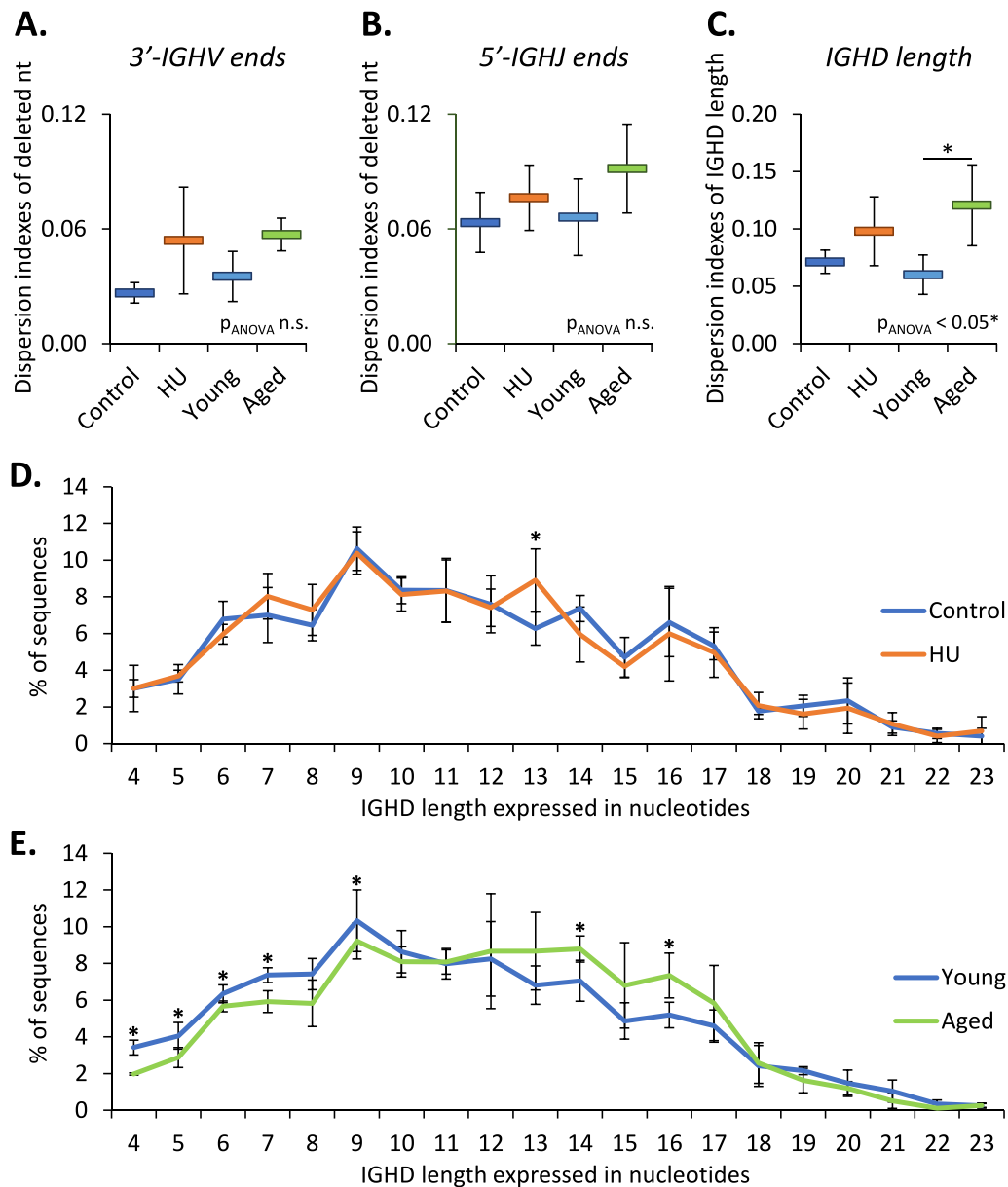
To our knowledge, this is the first time that the bone marrow IgM repertoire of aged (18 months) C57BL/6J mice has been studied by high-throughput sequencing. As this mouse strain is a model used in many research fields (a PubMed database search on June 05, 2023, found 25,982 results containing the word C57BL/6J) [30], these





**Fig. 6** RAG1 (A), TdT (B) and Artemis (C) mRNA relative expression. These transcripts were analyzed by RT-qPCR in the bone marrow of HU ( $n=24$ ), control ( $n=24$ ), aged ( $n=27$ ) and young ( $n=27$ ) mice. mRNA levels were normalized to three housekeeping transcripts. The relative value obtained with controls (Control and Young groups) was set to 1. Data are shown as the means  $\pm$  SDs. Statistically significant differences were found using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; n.s., nonsignificant





**Fig. 7** Nucleotides trimmed off IGHV, IGHJ and IGHD segments during V(D)J recombination. **A, B, C** Dispersion indexes of genomic nucleotides deleted at the 3' end of IGHV (**A**), at the 5' end of IGHJ (**B**), and at both ends of the IGHD segments (indicated by IGHD length) (**C**) for control vs. HU and young vs. aged mice. **D, E** Frequencies of sequences according to the length, in nucleotides, of IGHD segments in control vs. HU (**D**) and young vs. aged (**E**) mice. Data are shown as the means  $\pm$  SDs of 4 groups, each comprising 5 mice ( $N=4$ ,  $n=5$ ). Statistically significant differences were found using one-way ANOVA followed by a Tukey–Kramer post hoc test (**A**) and Mann–Whitney or unpaired t tests (**B**).  $*p \leq 0.05$ ; n.s., nonsignificant

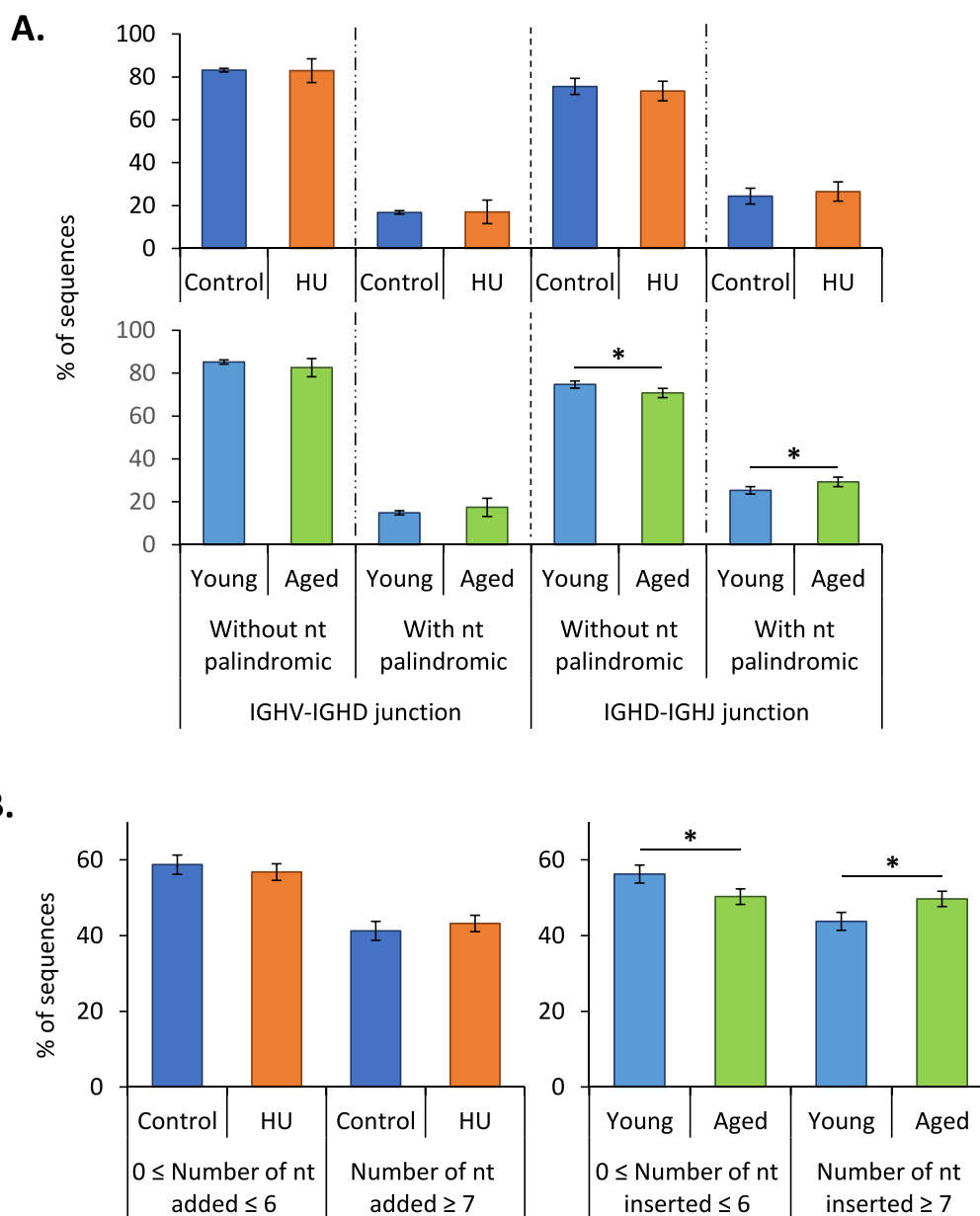
high-throughput sequencing data deposited in the NCBI Sequence Read Archive could [31], beyond the purpose of this study, be useful to the scientific community at large.

**HU modifies the bone marrow IgM repertoire but has a weaker effect than aging**

The effects of four weeks of HU on the bone marrow antibody repertoire of five 2.5-month-old unimmunized female C57BL/6J mice were previously studied [7]. As

noted here, this study reported changes in heavy-chain gene segment usage and combinations. Interestingly, modifications in the use of multiple IGHV, IGHD and IGHJ gene segments in splenic B cells and significant differences in B-cell repertoires of class-switched B cells (antigen-experienced B cells) were also reported in these mice [8]. These results combined with ours show that the antibody repertoire is affected by HU both in the bone marrow and the periphery in both sexes of the same





**Fig. 8** Palindromes created by Artemis and nucleotides added by TdT during V(D)J recombination. **A** Frequencies of sequences without or with palindromic nucleotides at IGHV-IGHD and IGHD-IGHJ junctions in control vs. HU and young vs. aged mice. **B** Frequencies of sequences according to the number of added nongenomic nucleotides ( $\leq 6$  or  $\geq 7$  added nucleotides) in control vs. HU and young vs. aged mice. Data are shown as the means  $\pm$  SDs of 4 groups, each comprising 5 mice ( $N=4, n=5$ ). Statistically significant differences were found using Mann-Whitney or unpaired t tests. \* $p \leq 0.05$

mouse strain, although the age (2.5 vs. 3.5 months) and HU duration (4 weeks vs. 3 weeks) were not the same. In contrast, a short spaceflight (21–22 days) had no statistically significant effect on the antibody repertoire of five unimmunized 8.7-month-old female C57Bl/6Tac mice [32], while changes in the IgM repertoire of cosmonauts (median age of  $48 \pm 2$  years) involved in long-duration space missions (ranging from 124 to 186 days) on the ISS

were noted on an individual basis [4]. This suggests that the effect of spaceflight on the antibody repertoire could be conditioned by flight duration. A trend toward a lower diversity of the antibody repertoire in these C57Bl/6Tac mice that underwent spaceflight was suggested [5], as noted in aged mice [33]. Repertoire diversity is determined by two separate factors: the number of distinct B-cell lineages present and the number of different



somatic mutations existing within each lineage [34]. Given our approach based on the amplification of VDJ rearrangements contained in IgM heavy chain mRNAs and the selection of unique CDR3s, the number of distinct B-cell lineages could not be determined. Indeed, a lineage or clone is defined as a set of sequences derived from the same putative VDJ rearrangement event, identified by requiring sequences to have the same IGHV segment, the same IGHJ segment, the same CDR3 length, and 90% similarity in the CDR3 [34]. Thus, we cannot make any conclusions regarding the effects of HU on IgM repertoire diversity. However, we observed increases in mean DIs for unique VDJ associations in HU and aged mice compared to their respective controls. This observation could be explained by an increase in the mutation rate in CDR3s, as in elderly individuals' B-cell repertoires [35, 36]. Indeed, our data show that HU and aging change the amino acid composition of the most frequent CDR3s.

Our results also show that aging reduces the expression of transcripts encoding two major effectors of the V(D)J recombination process. These observations are consistent with previous works that have shown that the expression of RAG1 significantly decreases with age in human pro-B cells [37], that the percentage of pro-B cells expressing RAG2 is reduced in aged mice [38] and that there is an age-associated decline in TdT in humans and mice [39].

In addition to the effects on the bone marrow IgM repertoire, decreases in B-cell responses have previously been reported in HU [22] and aged mice [40], with a reduction in affinity maturation of antibodies, as noted when adult amphibians (*P. waltl*) were immunized during a 5-month spaceflight [12]. Furthermore, age is known to reduce the capacity to respond to vaccinations [35], and HU has been shown to delay and decrease murine antibody production in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection [41]. Combined with the modification in the bone marrow IgM repertoire reported in the present study and our previous observation that HU leads to decreased B lymphopoiesis, similar to aging [16], these data reinforce the idea that, as suggested by Strollo and Vernikos [42], microgravity accelerates age-related processes.

Thus, alterations in the antibody repertoire combined with other immune alterations, such as persistent low-grade systemic inflammation [43–46] and changes in immune cell function [46–51], could increase the clinical impacts of spaceflight on the immune system. Indeed, it was shown that a 5-month spaceflight negatively affected amphibian antibody production in response to antigen stimulation [9–12] and that a prolonged mission on the ISS significantly modified the IgM repertoire of some cosmonauts [4]. Antigen challenge experiments will be

necessary to elucidate the consequences of changes in the antibody repertoire on immunocompetence during extended space missions.

#### Likely causes of IgM repertoire changes

Stress is an unlikely to cause these changes, as we did not observe increases in serum corticosterone concentration in HU and aged mice or changes in the level of NR3C1 transcripts that should decrease in response to stress [52]. Although we cannot rule out a transient increase in corticosterone in the first days of HU, this is unlikely to explain changes in the bone marrow antibody repertoire.

Age- and HU-associated bone remodeling is a highly probable contributor to changes in the antibody repertoire, as we previously demonstrated that 21 days of HU induced changes in tibial trabecular microarchitecture that were similar but less pronounced than those that occurred with age [16]. Indeed, B-cell progenitors depend on distinct bone marrow niches at different stages of differentiation [53]. Given that HU, similar to aging, leads to an imbalance between bone formation and resorption with a net loss of bone mass, it is very likely that HU, similar to aging, negatively affects endosteal niches and, consequently, committed B progenitors. As with increasing age, spaceflight is associated with osteoporosis with heterogeneity in the magnitude of bone loss among individuals [54]. It is therefore possible that bone remodeling induced by long-duration spaceflight in some individuals could contribute to explaining why the IgM repertoire of two out of five analyzed cosmonauts was significantly altered during an extended mission aboard the ISS [4]. In these two individuals, IgM repertoire changes, correlated with changes in the V(D)J recombination process and coincided with a higher stress response, suggesting that the effects on the IgM repertoire and V(D)J recombination could also depend on the development of a stress response that was not observed in our mice. As future deep-space exploration missions will be of unprecedented duration, we should consider the extent to which bone loss aggravation during such missions will affect the bone marrow antibody repertoire and consequently the immune capacities of the hosts. We should also consider whether extending HU exposure would enhance similarities with the antibody repertoire of aged mice, as it has been shown that the loss of osteoblasts is proportional to HU duration [55]. Further studies will be needed to address these important questions.

Finally, our data show that, unlike in aged mice, the changes in the bone marrow IgM repertoire of mice subjected to 21 days of HU cannot be attributed to a change in the V(D)J recombination process. Similarly, we previously showed that a model of socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affects



the murine TCR $\beta$  repertoire but does not affect V(D)J recombination [56]. If the V(D)J recombination process is not affected under these conditions, epigenetics appears to be another highly probable contributor to changes in the IgM repertoire. Indeed, we previously demonstrated that HU impairs IL-7 signaling in murine pro-B cells [18], which profoundly influences IGHV segment selection [20]. Additionally, we show here that HU induces changes in the use of distal IGHV segments, while age induces changes in the use of distal and median IGHV segments of the murine *IGH* locus. It has been established that the accessibility of Ig gene segments depends on epigenetic factors and chromatin conformation [19, 27, 57], and studies have reported epigenetic deregulation in response to microgravity in human blood-derived stem cells [58] and human mesenchymal stem cells [59]. A decrease in a specific histone modification, H3K27me3, was also shown at the TCR $\beta$  locus in murine thymocytes following hypergravity exposure [60]. It is also known that age affects DNA methylation and histone posttranslational modifications [61, 62]. Thus, in the future, it would be very interesting to determine the contribution of epigenetic factors to the regulation of chromatin structure in the three areas of the *IGH* locus in HU and aged mice to understand the mechanisms underlying changes in the antibody repertoire in these two situations. EZH2 methyltransferase, which is involved in the regulation of H3K27me3 levels, and H3K27me3 are interesting candidates because both are essential for the choice between proximal and distal IGHV segments [63].

### Limitations

This study is limited by the fact that we might have missed some unique rearrangements corresponding to rare B-cell clones, as indicated by a study that compared datasets generated with or without amplification [64]. However, we are confident in our results because the number of IGHV segments analyzed and detected in our libraries shows that they provide an accurate picture of IGH rearrangements. Another limitation is that bone marrow contains, in addition to naive B cells, memory and plasma B cells, the contribution of which to the modification of the IgM repertoire could not be determined since our libraries were prepared from whole bone marrow.

### Conclusion and perspectives

In conclusion, this study shows that HU, a physiological model of microgravity causing a decrease in pro-B and pre-B cells in the bone marrow [16], induced changes in the IgM repertoire within 21 days that were approximately 3-fold less than those in aged mice, which is a rapid effect. These alterations in the antibody repertoire,

combined with other previously described immune alterations such as inflammation and changes in immune cell function, could increase the clinical impacts of spaceflight on the immune system, as in elderly individuals. Bone remodeling and epigenetics likely mediated the change in the IgM repertoire in HU and aged mice. Thus, countermeasures to preserve bone microarchitecture, such as physical exercise [54], omega-3 supplementation [65], or oral administration of mother-of-pearl powder [66, 67], could possibly preserve murine B lymphopoiesis and the bone marrow antibody repertoire. These examples are promising avenues for further study. It would also be interesting to compare the quality of the humoral response induced by an antigen in 2.5-month-old mice subjected to 21 days of HU and in aged mice, determine whether the effects of HU are reversible (unlike aging), and examine the effects of HU at early and late time points. Finally, it is worth noting that in addition to its relevance to spaceflight, HU is potentially a useful analog for studying the impact of physical inactivity [6], offering new insights into the contribution of sedentary behavior to immune changes.

## Methods

### Animals

C57BL/6J male mice (2.5- and 13-month-old) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresles, France). Thirteen-month-old mice were kept in our animal house until they were 18 months old for comparison with 2.5-month-old mice subjected to 21 days of HU. Mice were housed in standard cages (2–3 mice per cage, 36 cm deep  $\times$  20 cm wide  $\times$  14 cm high) in a quiet room under constant conditions (22°C, 50% relative humidity, 12-h light/dark cycles, dark period from 8 pm to 8 am) and were provided food and water ad libitum. Animals were treated in accordance with the French Legislation and the Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (2010/63/UE). The experiments were approved by the Lorraine Ethical Committee on Animal Experimentation (authorization CELMEA-2012-0008), and the authors complied with the ARRIVE guidelines.

### Hindlimb unloading

Two-and-a-half-month-old mice were isolated one week before the beginning of the experiments in HU cages manufactured according to Chapes et al. [68] (30 cm deep  $\times$  15 cm wide  $\times$  26 cm high). In the first experiment, 3 groups of 10 mice were used (control, restrained, and HU). These three groups were housed in three different vented animal cabinets (Noroit, Bouaye, France). HU mice were suspended by using a dressing retention sheet



wrapped around the tail and a wire hooked on a swivel pulley system. The swivel pulley was designed to glide along two stainless steel rods that ran the length of the cage, providing a full 360° range of movement. The angle of suspension for HU mice was adjusted to 25–30° such that only the forelimbs touched the grid placed on the litter. Orthostatically restrained mice were not suspended, so all limbs were in contact with the grid. Control mice were not restrained. Throughout the 21 days of treatment, mice were provided with food and water ad libitum. Since we observed no differences in our analyses between the control and restrained groups, we decided, for the second experiment, to divide the 30 mice into two groups, 15 control mice and 15 HU mice, that were housed in two different vented animal cabinets.

#### Serum and bone marrow collection

Mice were anesthetized using 5% isoflurane and then euthanized by cervical dislocation between 8 and 10 am to avoid fluctuations in corticosterone concentration due to circadian rhythm. Blood was collected by cardiac puncture, allowed to clot at room temperature for 15 min and centrifuged at 4°C and 4000 rpm for 20 min to obtain serum samples, which were stored at -80°C until analysis. Bone marrow from femurs and tibias was flushed with RPMI-1640 medium. Red blood cells were lysed in 2 mL of 1x RBC lysis buffer (eBioscience, Affymetrix, Rennes, France) for 2 min on ice, and the reaction was stopped by adding 10 mL of PBS containing 2% FBS. After centrifugation at 1600 rpm and 4°C for 5 min, the cell pellet was resuspended in 5 mL of PBS containing 2% FBS, and the cell density was determined using a Scepter™ 2.0 Cell Counter (Merck Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France).

#### Corticosterone quantification

Corticosterone in serum samples was quantified using the DetextX® Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (ArborAssays, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples were analyzed in duplicate. Absorbance at 405 nm was measured, and corticosterone concentrations, deduced from a standard curve generated using calibrators, were expressed in ng/mL.

#### Flow cytometry

Bone marrow cells ( $5 \times 10^5$ ) were stained with anti-B220-PE (RA3-6B2; Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France), anti-CD43-FITC (S7; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-CD19-APC-Cy7 (1D3; Ozyme) and anti-IgM-PE-Cy7 (R6-60.2; BD Biosciences) antibodies. Anti-rat IgG2a  $\kappa$  isotype control FITC (RTK2758) and anti-rat IgG2a  $\kappa$  isotype control APC-Cy7 (RTK2758) antibodies

were purchased from Ozyme. Anti-rat IgG2a  $\kappa$  isotype control PE-Cy7 (eBR2a) and anti-rat IgG2a  $\kappa$  isotype control PE (eBR2a) antibodies were purchased from eBioscience (eBioscience, Paris, France). Cells were analyzed using the Gallios flow cytometer (Beckman-Coulter, Villepinte, France) of UAR IBSLor from Lorraine University (Vandoeuvre-lès-Nancy, France). The results were analyzed using FlowJo® software (Tree Star Inc., OR, USA). Pro-B and pre-B cells were identified based on the expression of the following markers: pro-B cells (B220<sup>lo</sup> CD43<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup>) and pre-B cells (B220<sup>lo</sup> CD43<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup>).

#### RT-qPCR

Total RNA was extracted from  $10^7$  bone marrow nucleated cells using the NucleoSpin® RNA Plus Kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France). RNA (1.5 µg for each sample) was reverse transcribed using random primers, RNaseOUT and M-MLV reverse transcriptase following the manufacturer's instructions (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). qPCRs were conducted with a Mastercycler® realplex<sup>2</sup> real-time PCR machine (Eppendorf, Hamburg, Germany). Each qPCR was performed in triplicate using Takyon No ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP (Eurogentec, Angers, France). The cycling protocol was as follows: 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at the annealing temperature indicated in Additional file 4. The relative expression levels of RAG1, Artemis, TdT and nuclear receptor subfamily 3 group C (NR3C1) were normalized to 3 housekeeping transcripts (elongation factor 1 alpha (Efla), glucuronidase- $\beta$  (GUSB) and TATA-binding protein (TBP)). The stability of housekeeping transcripts was checked using Bestkeeper software [69]. Primer pairs were designed for different exons to ensure that they could not hybridize to potential traces of genomic DNA, and their specificities were checked using a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search through the U.S. National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA).

#### Illumina sequencing of IGH $\mu$ transcripts

VDJ rearrangements contained in Ig  $\mu$  heavy chain (IGH $\mu$ ) mRNAs were amplified by 5'-RACE PCR using the SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA). For each group of mice (HU and corresponding controls, aged and corresponding controls), equal amounts (200 ng) of total RNA extracted from bone marrow nucleated cells of five mice in the same group were mixed and reverse transcribed according to the manufacturer's instructions to reduce interindividual variability in an effort to normalize the reading. Then, two successive PCRs were performed to amplify VDJ associations. The first PCR was performed using a



gene-specific primer, GSP1 (see Additional file 4), which anneals to the first constant domain of Ig  $\mu$  transcripts and the UPM primer provided in the kit. The second was performed on an aliquot of the first PCR using another gene-specific primer, GSP2 (see Additional file 4), which anneals upstream of GSP1, and the NUP primer annealing to UPM. PCR products generated by this second PCR were separated on an agarose gel, and those of the expected size (0.6kb) were purified using the Nucleospin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey Nagel, Hoerdtt, France). Libraries were prepared by adding Illumina adapter sequences (NEBNext<sup>®</sup> Index Primer for Illumina) to these PCR products, and high-throughput sequencing was performed from both ends (2×300bp paired-end DNA sequencing) using the Illumina MiSeq sequencer of UAR IBSLor from Lorraine University (Vandoeuvre-lès-Nancy, France). Sequencing data were analyzed using IMGT/High V-quest software [70] (<http://www.imgt.org>) [23]. The obtained data were then analyzed using specific software (see below). Sequencing data have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) [31] under accession numbers PRJNA559699 for young/aged mice and PRJNA559675 for control/HU mice.

#### Software program dedicated to the analysis of VDJ sequences

A program written in Perl was created to calculate the necessary parameters for our studies. This program parsed 16 different files, corresponding to 16 different types of samples (4 for young mice, 4 for aged mice, 4 for HU mice and 4 for control mice), produced by IMGT/HighV-quest [23]. Two to four seconds of execution was necessary to analyze a file. This execution time was proportional to the number of lines to process, with each line corresponding to 1 sequence. There were 506,399 to 960,860 lines for young mice, 332,443 to 488,167 lines for aged mice, 179,149 to 337,558 lines for HU mice, and 357,791 to 678,075 lines for control mice. The program examined each row and identified those having a CDR3 and a productive functionality. The redundancy of this set of CDR3 sequences was then calculated. A new set of results consisting of 1 representative of each CDR3 sequence expressed 1 or more times was then generated. The number of sequences with unique CDR3s ranged from 19,404 to 23,826 for young mice, 22,714 to 27,241 for aged mice, 10,406 to 20,222 for HU mice and 19,223 to 22,744 for control mice. From this set of results, the following were calculated for functional sequences: the frequency of each IGHV, IGHD and IGHJ segment; CDR3 length; the length of IGHD; the number of nucleotides deleted at 3'-IGHV and 5'-IGHJ extremities; the number of sequences having added nongenic nucleotides; the

frequencies of palindromes at IGHV-IGHD and IGHD-IGHJ junctions; and, finally, associations of all IGHV segments with all IGHJ segments for combinations having no IGHD or each IGHD segment.

#### Statistical analysis

Dispersion indexes were used to determine if differences existed between control vs. HU and young vs. aged mice for the analyzed parameters. These indexes were calculated as previously described [4, 56]. GraphPad Prism 9.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used to perform statistical analyses. For two-group comparisons, the homogeneity of variance was determined using the Fisher test, and the normality of distribution was determined using the Kolmogorov–Smirnov test. When homogenous variances and distributions were observed, Student's *t* tests were performed. When the variance and distribution were not homogeneous, Mann–Whitney nonparametric tests were performed. In the case of multiple comparisons, the homogeneity of variance was determined using the Bartlett test, and the normality of distribution was determined using the Shapiro–Wilk test. When homogenous variance and a normal distribution were observed, one-way ANOVA tests were performed, followed by a Tukey–Kramer post hoc test. When the variance and/or distribution were not homogeneous, Kruskal–Wallis nonparametric tests were performed followed by Dunn's post hoc test. *P* values < 0.05 indicate significance. The results are shown as the means  $\pm$  standard errors of the means (SEM).

#### Abbreviations

DI	dispersion index
Ef1a	elongation factor 1 alpha
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
GUSB	glucuronidase beta
IGH	immunoglobulin heavy-chain locus
IGHD	immunoglobulin heavy-chain diversity gene segment
IGHJ	immunoglobulin heavy-chain joining gene segment
IGHV	immunoglobulin heavy-chain variable gene segment
IMGT	International Immunogenetics Information System
H3K27me3	histone H3 lysine 27 trimethylation
HU	hindlimb unloading
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
NUP	nested universal primer
RSS	recombination signal sequence
TBP	TATA-binding protein
UPM	universal primer mix

#### Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12979-023-00393-1>.

**Additional file 1: Table S1.** IGHV gene segments detected within our libraries of unique functional sequences.



**Additional file 2: Fig. S1.** IGHV, IGHD and IGHJ segment usage in the control groups.

**Additional file 3: Fig. S2.** Analyses of IgM CDR3s in control groups.

**Additional file 4: Table S2.** Primers used in this study.

### Acknowledgments

We thank UAR IBSLor, Lorraine University, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

### Authors' contributions

C.F. and S.G. performed the experiments. C.F. and S.G. prepared figures. A.V. conceived the software needed for this project. C.F., P.J., A.V. and S.G. analyzed the data. C.F., P.J., A.V., S.G. and J.P.F. interpreted the data and wrote the manuscript. J.P.F. and S.G. designed the project. J.P.F. obtained funding. All the authors have reviewed and approved the manuscript.

### Funding

This research was funded by the French Space Agency (CNES) (DAR 4800000841, DAR 4800000894 and DAR 4800000950), the French Ministry of Higher Education and Research, the Université de Lorraine, the Région Lorraine, the Communauté Urbaine du Grand Nancy and the French State-Region Project Contract (CPER). Funding bodies had no role in the design of the study; collection, analysis, and interpretation of data; or writing of the manuscript.

### Availability of data and materials

The sequencing datasets generated and analyzed during the current study have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) [31] under accession numbers PRJNA559699 for young/aged mice and PRJNA559675 for control/HU mice. All other data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

Animals were treated in accordance with the French Legislation and the Council Directive of the European Communities on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (2010/63/UE). Experiments were approved by the Lorraine Ethical Committee on Animal Experimentation (approval number: CELMEA-2012-0008), and the authors complied with the ARRIVE guidelines.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 5 June 2023 Accepted: 12 November 2023

Published online: 20 November 2023

### References

- Crucian B, Babiak-Vazquez A, Johnston S, Pierson D, Ott CM, Sams C. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *Int J Gen Med*. 2016;9:383–91.
- Spielmann G, Agha N, Kunz H, Simpson RJ, Crucian B, Mehta S, et al. B cell homeostasis is maintained during long-duration spaceflight. *J Appl Physiol*. 2019;126:469–76.
- Bonnefoy J, Baselet B, Moser D, Ghislin S, Miranda S, Riant E, et al. B-cell homeostasis is maintained during two months of Head-down tilt bed rest with or without antioxidant supplementation. *Front Immunol*. 2022;13:830662.
- Buchheim J, Ghislin S, Ouzren N, Albuissou E, Vanet A, Matzel S, et al. Plasticity of the human IgM repertoire in response to long-term spaceflight. *FASEB J*. 2020;34:16144–62.
- Rettig TA, Tan JC, Nishiyama NC, Chapes SK, Pecaut MJ. An analysis of the effects of spaceflight and vaccination on antibody repertoire diversity. *Immunohorizons*. 2021;5:675–86.
- Globus RK, Morey-Holton E. Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. *J Appl Physiol*. 2016;120:1196–206.
- Rettig TA, Nishiyama NC, Pecaut MJ, Chapes SK. Effects of skeletal unloading on the bone marrow antibody repertoire of tetanus toxoid and/or CpG treated C57BL/6J mice. *Life Sci Space Res*. 2019;22:16–28.
- Rettig TA, Bye BA, Nishiyama NC, Hlavacek S, Ward C, Pecaut MJ, et al. Effects of skeletal unloading on the antibody repertoire of tetanus toxoid and/or CpG treated C57BL/6J mice. *PLoS One*. 2019;14:e0210284.
- Boxio R, Dournon C, Fripiat J-P. Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J Appl Physiol*. 2005;98:905–10.
- Bascope M, Huin-Schohn C, Guéguinou N, Tschirhart E, Fripiat J-P. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J*. 2009;23:1607–15.
- Fripiat J-P. Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. *Mol Immunol*. 2013;56:434–41.
- Bascope M, Guéguinou N, Schaerlinger B, Gauquelin-Koch G, Fripiat J-P. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J*. 2011;25:2947–55.
- Schatz DG, Swanson PC. V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu Rev Genet*. 2011;45:167–202.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*. 2002;108:781–94.
- Huin-Schohn C, Guéguinou N, Schenten V, Bascope M, Koch GG, Baatout S, et al. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB J*. 2013;27:333–41.
- Lescale C, Schenten V, Djeghloul D, Bennabi M, Gaignier F, Vandamme K, et al. Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. *FASEB J*. 2015;29:455–63.
- Tascher G, Gerbaix M, Maes P, Chazarin B, Ghislin S, Antropova E, et al. Analysis of femurs from mice embarked on board BION-M1 biosatellite reveals a decrease in immune cell development, including B cells, after 1 wk of recovery on earth. *FASEB J*. 2019;33:3772–83.
- Lescale C, Dias S, Maës J, Cumano A, Szabo P, Charron D, et al. Reduced EBF expression underlies loss of B-cell potential of hematopoietic progenitors with age. *Aging Cell*. 2010;9:410–9.
- Pulivarthy SR, Lion M, Kuzu G, Matthews AGW, Borowsky ML, Morris J, et al. Regulated large-scale nucleosome density patterns and precise nucleosome positioning correlate with V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E6427–36.
- Baizan-Edge A, Stubbs BA, Stubbington MJT, Bolland DJ, Tabbada K, Andrews S, et al. IL-7R signaling activates widespread VH and DH gene usage to drive antibody diversity in bone marrow B cells. *Cell Rep*. 2021;36:109349.
- Taves MD, Hamden JE, Soma KK. Local glucocorticoid production in lymphoid organs of mice and birds: functions in lymphocyte development. *Horm Behav*. 2017;88:4–14.
- Gaignier F, Schenten V, De Carvalho BM, Gauquelin-Koch G, Fripiat J-P, Legrand-Frossi C. Three weeks of murine Hindlimb unloading induces shifts from B to T and from Th to Tc splenic lymphocytes in absence of stress and differentially reduces cell-specific Mitogenic responses. *PLoS One*. 2014;9:e92664.
- The International Immunogenetics Information System: IMGT. <https://www.imgt.org/>. Accessed 05 June 2023.
- Rettig TA, Ward C, Pecaut MJ, Chapes SK. Validation of methods to assess the immunoglobulin gene repertoire in tissues obtained from mice on the international Space Station. *Gravit Space Res*. 2017;5:2–23.
- Rettig TA, Ward C, Bye BA, Pecaut MJ, Chapes SK. Characterization of the naive murine antibody repertoire using an unamplified high-throughput sequencing. *PLoS One*. 2018;13:e0190982.
- Johnston CM, Wood AL, Bolland DJ, Corcoran AE. Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region. *J Immunol*. 2006;176:4221–34.



27. Dong Y, Wu C, Zhao X, Zhang P, Zhang H, Zheng M, et al. Epigenetic modifications of the V<sub>H</sub> region after DJ<sub>H</sub> recombination in pro-B cells. *Immunology*. 2017;152:218–31.
28. Gong M, Li X, Zheng A, Xu H, Xie S, Yan R, et al. Age-related changes in the TRB and IGH repertoires in healthy adult males and females. *Immunol Lett*. 2021;240:71–6.
29. Lucas JS, Murre C, Feeney AJ, Riblet R. The structure and regulation of the immunoglobulin loci. In: Alt FW, Honjo T, Radbruch A, Reth M, editors. *Molecular biology of B cells*. Elsevier; 2015. p. 1–11.
30. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed 05 June 2023.
31. The NCBI Sequence Read Archive. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>. Accessed 05 June 2023.
32. Ward C, Rettig TA, Hlavacek S, Bye BA, Pecaute MJ, Chapes SK. Effects of spaceflight on the immunoglobulin repertoire of unimmunized C57BL/6 mice. *Life Sci Space Res*. 2018;16:63–75.
33. Guerretaz LM, Johnson SA, Cambier JC. Acquired hematopoietic stem cell defects determine B-cell repertoire changes associated with aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:11898–902.
34. De Bourcy CFA, Angel CJL, Vollmers C, Dekker CL, Davis MM, Quake SR. Phylogenetic analysis of the human antibody repertoire reveals quantitative signatures of immune senescence and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:1105–10.
35. Jiang N, He J, Weinstein JA, Penland L, Sasaki S, He X-S, et al. Lineage structure of the human antibody repertoire in response to influenza vaccination. *Sci Transl Med*. 2013;5:171ra19.
36. Wang C, Liu Y, Xu LT, Jackson KJL, Roskin KM, Pham TD, et al. Effects of aging, cytomegalovirus infection, and EBV infection on human B cell repertoires. *J Immunol*. 2014;192:603–11.
37. Jensen K, Rother MB, Brusletto BS, Olstad OK, Dalsbotten Aass HC, Van Zelm MC, et al. Increased ID2 levels in adult precursor B cells as compared with children is associated with impaired Ig locus contraction and decreased bone marrow output. *J Immunol*. 2013;191:1210–9.
38. Labrie JE, Borghesi L, Gerstein RM. Bone marrow microenvironmental changes in aged mice compromise V(D)J recombination activity and B cell generation. *Semin Immunol*. 2005;17:347–55.
39. Pahwa RN, Modak MJ, McMorrow T, Pahwa S, Fernandes G, Good RA. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme in thymus and bone marrow. I. Age-associated decline of TdT in humans and mice. *Cell Immunol*. 1981;58:39–48.
40. Speziali E, Santiago AF, Fernandes RM, Vaz NM, Menezes JS, Faria AMC. Specific immune responses but not basal functions of B and T cells are impaired in aged mice. *Cell Immunol*. 2009;256:1–5.
41. Aviles H, Belay T, Fountain K, Vance M, Sonnenfeld G. Increased susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infection under hindlimb-unloading conditions. *J Appl Physiol*. 2003;95:73–80.
42. Strollo F, Vernikos J. Aging-like metabolic and adrenal changes in microgravity: state of the art in preparation for Mars. *Neurosci Biobehav Rev*. 2021;126:236–42.
43. Crucian BE, Zwart SR, Mehta S, Uchakin P, Quiariarte HD, Pierson D, et al. Plasma cytokine concentrations indicate that *in vivo* hormonal regulation of immunity is altered during long-duration spaceflight. *J Interf Cytokine Res*. 2014;34:778–86.
44. Buchheim J-I, Matzel S, Rykova M, Vassilieva G, Ponomarev S, Nichiporuk I, et al. Stress related shift toward inflammation in cosmonauts after long-duration space flight. *Front Physiol*. 2019;10:85.
45. Krieger SS, Zwart SR, Mehta S, Wu H, Simpson RJ, Smith SM, et al. Alterations in saliva and plasma cytokine concentrations during long-duration spaceflight. *Front Immunol*. 2021;12:725748.
46. Jacob P, Bonnefoy J, Ghislin S, Frippiat J-P. Long-duration head-down tilt bed rest confirms the relevance of the neutrophil to lymphocyte ratio and suggests coupling it with the platelet to lymphocyte ratio to monitor the immune health of astronauts. *Front Immunol*. 2022;13:952928.
47. Crucian B, Stowe RP, Mehta S, Quiariarte H, Pierson D, Sams C. Alterations in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight. *NPJ Microgravity*. 2015;1:15013.
48. Frippiat J-P, Crucian BE, de Quervain DJ-F, Grimm D, Montano N, Praun S, et al. Towards human exploration of space: the THESEUS review series on immunology research priorities. *NPJ Microgravity*. 2016;2:16040.
49. Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, Bueb J-L, Tschirhart E, Legrand-Frossi C, et al. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J Leukoc Biol*. 2009;86:1027–38.
50. Akiyama T, Horie K, Hinoi E, Hiraiwa M, Kato A, Maekawa Y, et al. How does spaceflight affect the acquired immune system? *NPJ Microgravity*. 2020;6:14.
51. ElGindi M, Sapudom J, Ibrahim IH, Al-Sayegh M, Chen W, Garcia-Sabaté A, et al. May the force be with you (or not): the immune system under microgravity. *Cells*. 2021;10:1941.
52. Erdeljan P, MacDonald JF, Matthews SG. Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor (GR) but not mineralocorticoid receptor (MR) mRNA levels in fetal mouse hippocampal neurons, *in vitro*. *Brain Res*. 2001;896:130–6.
53. Mourcin F, Breton C, Tellier J, Narang P, Chasson L, Jorquera A, et al. Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. *Blood*. 2011;117:6552–61.
54. Vico L, Hargens A. Skeletal changes during and after spaceflight. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14:229–45.
55. Cabahug-Zuckerman P, Frikha-Benayed D, Majeska RJ, Tuthill A, Yakar S, Judex S, et al. Osteocyte apoptosis caused by Hindlimb unloading is required to trigger osteocyte RANKL production and subsequent resorption of cortical and trabecular bone in mice femurs. *J Bone Miner Res*. 2016;31:1356–65.
56. Fonte C, Kaminski S, Vanet A, Lanfumey L, Cohen-Salmon C, Ghislin S, et al. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR- $\beta$  repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB J*. 2019;33:896–908.
57. Montefiori L, Wuerffel R, Roqueiro D, Lajoie B, Guo C, Gerasimova T, et al. Extremely long-range chromatin loops link topological domains to facilitate a diverse antibody repertoire. *Cell Rep*. 2016;14:896–906.
58. Gambacurta A, Merlini G, Ruggiero C, Diedenhofen G, Battista N, Bari M, et al. Human osteogenic differentiation in space: proteomic and epigenetic clues to better understand osteoporosis. *Sci Rep*. 2019;9:8343.
59. Koaykul C, Kim M-H, Kawahara Y, Yuge L, Kino-Oka M. Maintenance of neurogenic differentiation potential in passaged bone marrow-derived human mesenchymal stem cells under simulated microgravity conditions. *Stem Cells Dev*. 2019;28:1552–61.
60. Calcagno G, Ouzren N, Kaminski S, Ghislin S, Frippiat J-P. Chronic Hypergravity induces a modification of histone H3 lysine 27 Trimethylation at TCR $\beta$  locus in murine Thymocytes. *Int J Mol Sci*. 2022;23:7133.
61. Sierra M, Fernández A, Fraga M. Epigenetics of aging. *Curr Genomics*. 2015;16:435–40.
62. Ucar D, Benayoun BA. Aging epigenetics. In: Moskalev A, Vaiserman AM, editors. *Epigenetics of aging and longevity*. Elsevier; 2018. p. 3–32.
63. Xu C-R, Schaffer L, Head SR, Feeney AJ. Reciprocal patterns of methylation of H3K36 and H3K27 on proximal vs. distal IgV<sub>H</sub> genes are modulated by IL-7 and Pax5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:8685–90.
64. Rettig TA, Pecaute MJ, Chapes SK. A comparison of unamplified and massively multiplexed PCR amplification for murine antibody repertoire sequencing. *FASEB Bioadv*. 2019;1:6–17.
65. Zwart SR, Pierson D, Mehta S, Gonda S, Smith SM. Capacity of omega-3 fatty acids or eicosapentaenoic acid to counteract weightlessness-induced bone loss by inhibiting NF- $\kappa$ B activation: from cells to bed rest to astronauts. *J Bone Miner Res*. 2010;25:1049–57.
66. Nguyen DK, Laroche N, Vanden-Bossche A, Linossier M, Thomas M, Peyroche S, et al. Protective effect on bone of nacre supplementation in Ovariectomized rats. *JBMR Plus*. 2022;6:e10655.
67. Carson M, Clarke S. Bioactive compounds from marine organisms: potential for bone growth and healing. *Mar Drugs*. 2018;16:340.
68. Chapes SK, Mastro AM, Sonnenfeld G, Berry WD. Antiorthostatic suspension as a model for the effects of spaceflight on the immune system. *J Leukoc Biol*. 1993;54:227–35.
69. Pfaff MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004;26:509–15.
70. Alamyar E, Duroux P, Lefranc M-P, Giudicelli V. IMGT<sup>®</sup> tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol Biol*. 2012;882:569–604.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

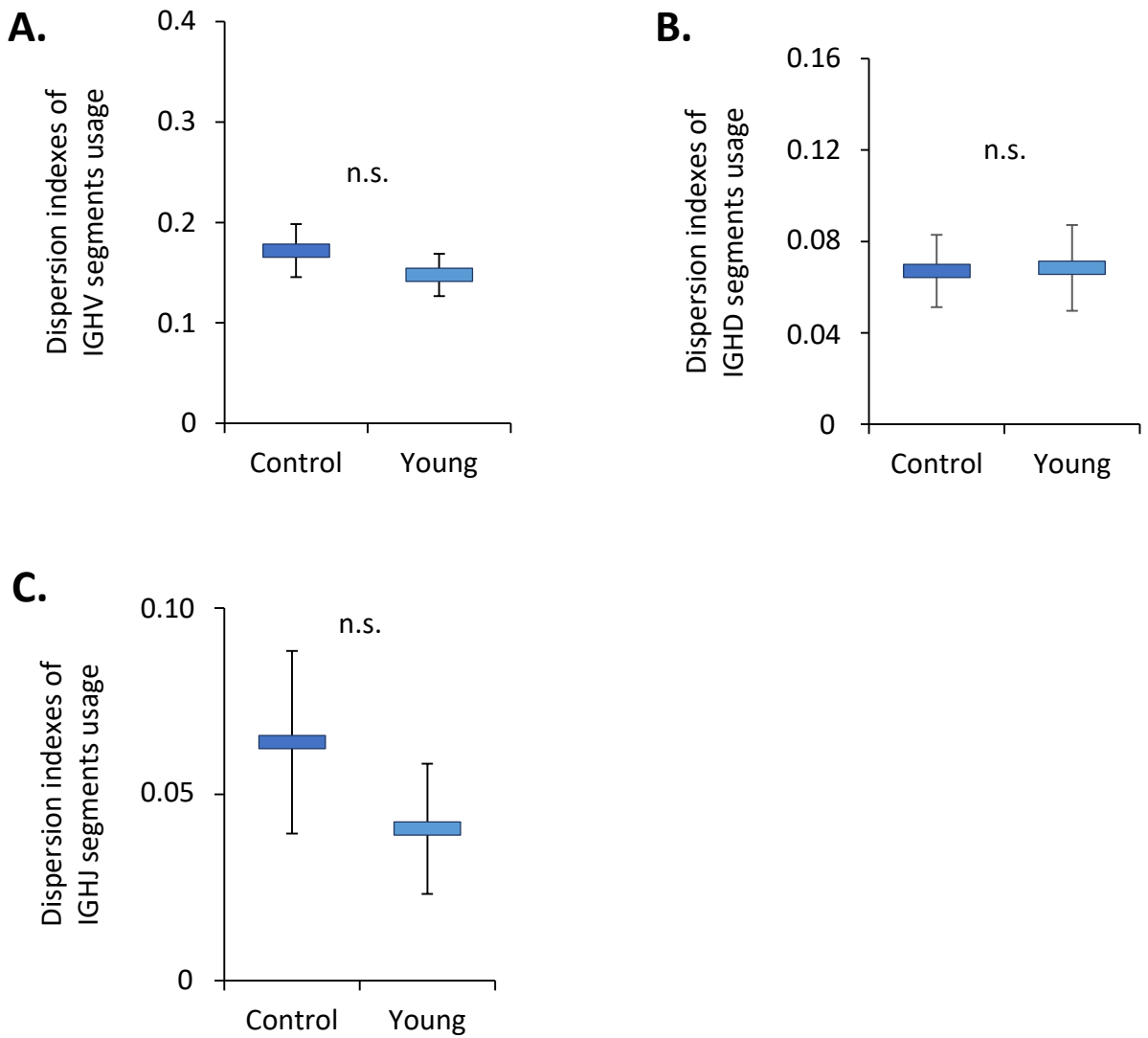


**Supplementary Table S1.** IGHV gene segments detected within our libraries of unique functional sequences.

	<i>IGHV subgroups</i>																<i>Total</i>	
	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	VH7	VH8	VH9	VH10	VH11	VH12	VH13	VH14	VH15	VH16		
<b>Total IGHV segments in the murine IGH locus</b>	111	11	9	2	24	7	4	21	4	4	2	3	2	4	2	1	1	211
<b>Functional IGHV segments according to IMGT</b>	67	9	7	1	12	4	3	7	4	2	2	1	1	4	1	0	0	125
<b>IGHV segments detected in our libraries of unique functional sequences</b>	66	7	7	2	10	5	4	11	4	2	2	3	2	4	1	0	0	130



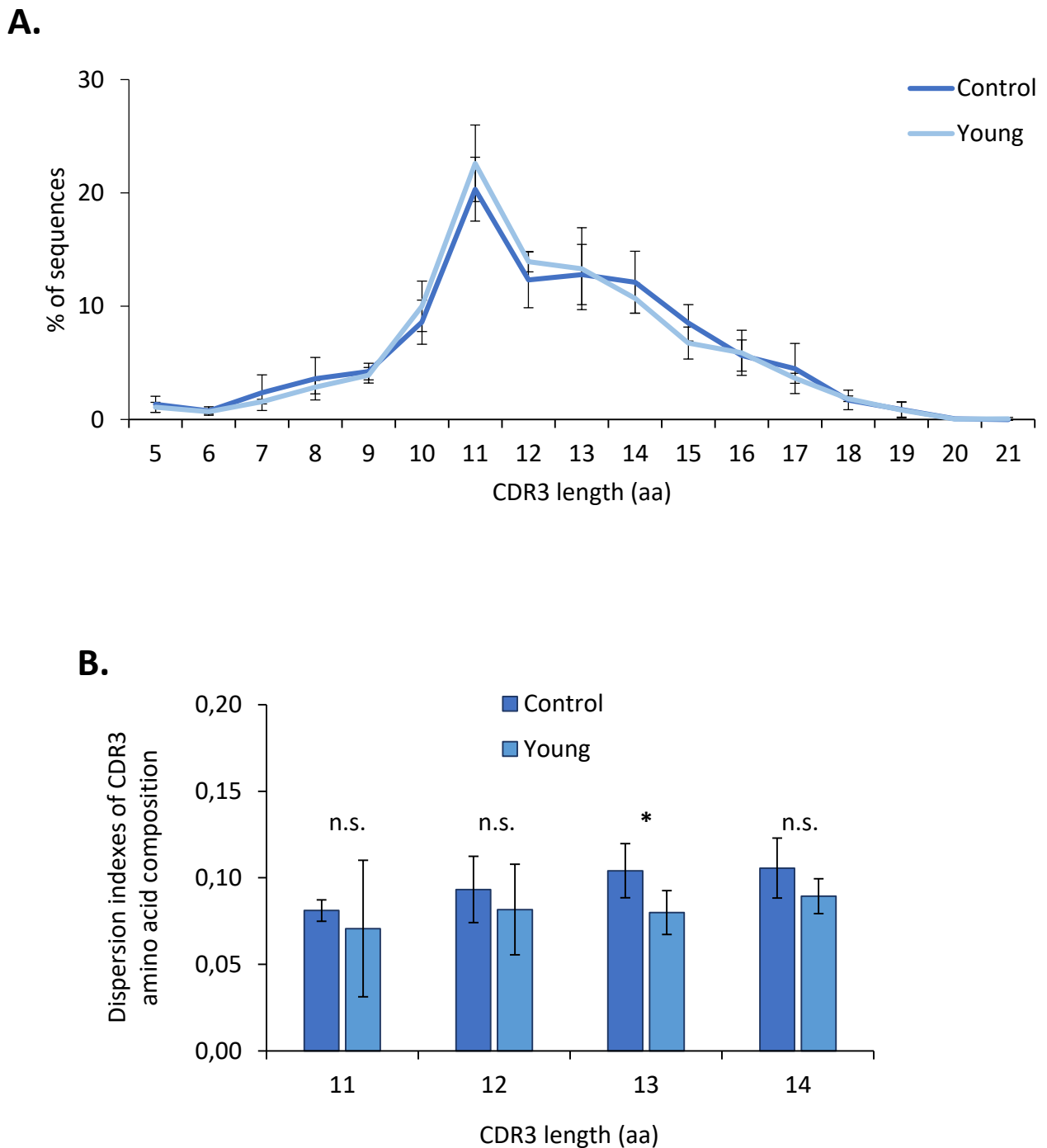
## Figure S1



**Figure S1.** IGHV, IGHD and IGHJ segment usage in the control groups. (A) Dispersion indexes for IGHV segment usage in the bone marrow of controls of HU experiments (Control group) and of young mice of the same age as the Control group used for comparison with aged mice (Young group). (B) Dispersion indexes for IGHD segment usage and (C) dispersion indexes for IGHJ segment usage in the bone marrow of the same groups. Data are shown as the means  $\pm$  SDs of 4 groups, each comprising 5 mice (N=4, n=5). No statistically significant differences were found using Mann-Whitney or unpaired t tests. n.s., nonsignificant.



## Figure S2



**Figure S2.** Analyses of IgM CDR3s in control groups. **(A)** Frequencies of sequences according to CDR3 length in controls of HU experiments (Control group) and in young mice of the same age as the Control group used for comparison with aged mice (Young group). **(B)** Analyses of CDR3s having the most frequent lengths (11 to 14 amino acids). Dispersion indexes for CDR3 amino acid composition. Data are shown as the means  $\pm$  SDs of 4 groups, each comprising 5 mice (N=4, n=5). Mann-Whitney or unpaired t tests were used to analyze data. \* $p \leq 0.05$ . n.s., nonsignificant.



**Supplementary Table S2.** Primers used in this study. F, forward; R, reverse.

Sequences		PCR product length (bp)	Annealing temperature (°C)
<b>qPCR</b>			
Ef1a	F 5'-AGAACCAGGCCAGAACCGAA-3' R 5'-GCAGCTGAGACTCCTTTCCA-3'	183	60.8
GUSB	F 5'-CCGATTATCCAGAGCGAGT-3' R 5'-CTCAGCGGTGACTGGTTTCG-3'	197	60.8
TBP	F 5'-CAAACCCAGAATTGTTCT-3' R 5'-ATGTGGTCTTCCTGAATCCCT-3'	131	58
RAG1	F 5'-GGCTCAGTCTACATCTGTACA-3' R 5'-ACGGACTCATGATACGGATTG-3'	143	59.2
TdT	F 5'-CGAAGACCTCGTTAGCTGTG-3' R 5'-TCATGTCCAGTCATCTTACCC-3'	140	60.8
Artemis	F 5'-CTAGGAGTCCGCACCACGT-3' R 5'-GGTGCAGGATATCAGGCATG-3'	147	60
NR3C1	F 5'-CAAGGGTCTGGAGAGGACAA-3' R 5'-TACAGCTTCCACACGTCAGC-3'	220	60.8
<b>5' RACE</b>			
GSP1	5'-GAAGGAAATGGTGCTGGGCAGGAAGTCC-3'	600-650	68
UPM	5'-CTAATACGATCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'		
GSP2	5'-TACACGACGCTCTTCCGATCTAGACAGGGGGCTCTCGCAGGAGACGA-3'		
NUP	5'-AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'		



## II. Etude de l'effet d'environnements extrêmes sur le répertoire BCR humain

La combinaison unique de stress physiques et stress socio-environnementaux qu'est l'exposome spatial a un effet délétère sur le système immunitaire. En effet, 15 des 29 astronautes participant aux missions Apollo ont développé des infections bactériennes et/ou virales directement à leur retour de mission ou une semaine après l'atterrissage (Kimzey et al., 1976). Plus récemment, il a été montré que 46% des astronautes présentent des problèmes immunologiques durant une mission de 6 mois à bord de l'ISS confirmant ainsi les observations faites sur lors des missions Apollo (Crucian et al., 2016). Ces dérégulations immunitaires représentent un risque important pour les futures missions d'exploration martiennes ou lunaires et peu de choses sont actuellement connues sur l'impact de l'exposome spatial sur le répertoire d'anticorps humain. A notre connaissance, seule l'étude pilote longitudinale effectuée au laboratoire a étudié le répertoire d'IgM de cosmonautes lors d'une mission de 6 mois à bord de l'ISS. Cette étude a montré des changements significatifs du répertoire d'IgM de 2 cosmonautes sur 5 corrélés à des changements du mécanisme de recombinaison V(D)J et des réponses aux stress plus importantes (Buchheim et al., 2020). Aucune autre étude n'a analysé l'impact des stress composant l'exposome spatial. En conséquence, nous avons déterminé l'impact de combinaisons précises de stress physiques et stress socio-environnementaux sur le répertoire d'anticorps humain en excluant la microgravité et les radiations spatiales. Ainsi, nous avons étudié l'impact d'hivernages à Concordia en Antarctique, un analogue fidèle de l'environnement spatial, sur le répertoire d'anticorps humain (Van Ombergen et al., 2021). De plus, l'étude du répertoire d'anticorps d'individus ayant séjourné dans la base Neumayer III située au niveau de la mer nous a permis de discriminer l'impact du stress hypoxique. Ainsi, nous avons pu observer des individus présentant de faibles ou de fortes modifications de leur répertoire BCR caractérisées par des changements significatifs dans les régions CDR3s des sites de liaison à l'antigène, des changements dans les activités des enzymes spécifiques de la recombinaison V(D)J et des niveaux de stress perturbés, soulignant l'importance des stress physiques et socio-environnementaux dans les changements de répertoire d'anticorps.



## **Article 2:**

Wintering in Antarctica reveal the contribution of physical and socio-environmental stressors to spaceflight-induced changes in the antibody repertoire, results of the CHOICE study

Pauline Jacob, Anne Vanet, Matthias Feurecker, Claudia Strewe, Tim Heitland, Carole D'Angoisse, Carmen Possnig, Peter Jonczyk, Stéphanie Ghislin, Alexander Choukér and Jean-Pol Frippiat

En cours de soumission.



**Wintering in Antarctica reveal the contribution of physical and socio -  
environmental stressors to spaceflight -induced changes in the antibody  
repertoire, results of the CHOICE study**

Pauline Jacob<sup>1</sup>, Anne Vanet<sup>1,2</sup>, Matthias Feuerecker<sup>3</sup>, Claudia Strewé<sup>3</sup>, Tim Heitland<sup>4</sup>, Carole D'Angoisse<sup>5</sup>, Carmen Possnig<sup>6</sup>, Peter Jonczyk<sup>7</sup>, Stéphanie Ghislin<sup>1†</sup> Alexander Choukér<sup>3†</sup>, and Jean-Pol Frippiat<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> UR SIMPA, Stress Immunity Pathogens Laboratory, Faculty of Medicine, Lorraine University, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

<sup>2</sup> Genoinformatics center, Jacques Monod Institute, UMR7592, CNRS, Paris, France.

<sup>3</sup> Laboratory of Translational Research "Stress and Immunity", Department of Anesthesiology, Hospital of the Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany.

<sup>4</sup> Alfred Wegener Institute, Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, Bremerhaven, Germany.

<sup>5</sup> King's College Hospital, Critical Care Service, London, U.K.

<sup>6</sup> Department of Sports Science, Division of Performance Physiology & Prevention, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria.

<sup>7</sup> Klinik Kitzinger Land, Kitzingen, Germany

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work and share last authorship

\* Corresponding author

**Keywords:** immunoglobulin, binding site, CDR3, gene segment, V(D)J recombination, extreme environment, deep-space missions.



Main text words count (introduction, results, discussion): 4268 words

Materials & methods word count: 1656 words



## Abstract

Spaceflight is associated to immune system dysregulation, including the antibody repertoire. To determine which kind of stressors encountered during a space mission has the strongest impact on this repertoire, we analyzed, using next-generation sequencing, the Ig heavy chain repertoire of volunteers wintering for a year in Antarctica in two stations: Neumayer III at sea level and Concordia at an altitude of 3233 m to evaluate the impact of hypoxia. These stations are recognized ground-based analogues of the space environment except for gravity changes and space radiation. Our results revealed that, as in a space crew, around 40% of individuals in both stations presented significant changes of their antibody repertoire; the one of individuals wintering in Neumayer III being less affected than the one of individuals wintering in Concordia likely because of hypoxia. Furthermore, these modifications were, as in cosmonauts, associated to a modification of the V(D)J recombination process responsible for creating antibody genes. Taken together, these results underline the importance of physical and socio-environmental stressors as factors responsible for changes in the antibody repertoire.



## Introduction

The space exosome is a unique combination of physical (hypergravity during take-off and landing, microgravity throughout the flight, solar and cosmic radiations, hypobaric hypoxia) and socio-environmental (confinement, isolation, circadian rhythm misalignment, high expectations in terms of performance, risk of equipment failure or fatal mishaps) stressors which are known to impact the immune system<sup>1,2</sup>. Indeed, 15 out of 29 Apollo astronauts developed bacterial or viral infections during, immediately after, or in the week after landing<sup>3</sup>. A more recent work analyzing medical data collected from 46 astronauts who spent six months onboard the International Space Station (ISS) confirmed these initial findings by showing that approximately 50% of them faced immunological problems, with infection being the second most frequent event<sup>4</sup>.

Spaceflight-induced immune system dysregulation, coupled with limited clinical care, therefore represents a risk for crew members, especially during future deep-space and interplanetary missions<sup>5,6</sup>. However, limited data are available about the effects of the space exosome on the human antibody repertoire whose diversity is mandatory to ensure an efficient protection of the host. While it was shown that B cell homeostasis is maintained during a long-duration mission on the ISS<sup>7</sup> and two months of head-down tilt bed rest, a ground-based analog of spaceflight<sup>8</sup>, the IgM repertoire of two out of five cosmonauts presented significant changes during long-duration missions on the ISS<sup>9</sup>. Interestingly, these changes persisted up to 30 days after landing, may have impacted the specificity of the IgM binding sites, correlated with changes in the V(D)J recombination process responsible for creating antibody genes, and coincided with a higher stress response. Furthermore, it has been shown that mice subjected to 21 days of hindlimb unloading- a model to study the effects of spaceflight, including situational and confinement stress, cephalic fluid shifts and lack of load bearing - showed significant changes in their antibody repertoire<sup>10</sup>. In the same way, it was shown that a 5month spaceflight affects amphibian antibody production in response to antigen stimulation<sup>11,12</sup>.

The European Space Agency (ESA) uses the Concordia station as an analogue of the space environment. Indeed, wintering in the French-Italian Concordia station in Antarctica replicates many of the spaceflight conditions such as isolation, confinement, high levels of autonomy, living in a small multicultural setting, disturbances of the circadian rhythm unusual for most humans and as extreme as those encountered for astronauts, limited resources, very limited and restricted access by outside help in case of emergency, and a very hostile external environment (**Figure 1A**)<sup>13,14</sup>. Additionally, as this station is at an altitude of 3233 m, the crew



is subjected to hypobaric and hypoxic conditions like astronauts for whom the spaceflight environment is perceived by their organism as a hypoxic hypobaric environment<sup>15</sup>.

In this study, we analyzed the impact of the Concordia environment on the human antibody repertoire to decipher the effects of microgravity and space radiation from those of other stressors. Using next-generation sequencing we analyzed the repertoire of Ig heavy chains (IgH) of 16 volunteers of equivalent age, half of which was confined at the Concordia station at an altitude of 3233 m (8 men) and the other half (5 men and 3 women) was confined at the German Antarctic Neumayer III station located at sea level<sup>16</sup>. Comparison of both stations enabled us to evaluate the impact of hypoxia. Our results revealed that almost 40% of individuals in both Neumayer III and Concordia had significant changes in their IgH repertoire at the level of CDR3, the main region for antigen recognition. These modifications were, as in cosmonauts, associated to a modification of the V(D)J recombination process. Interestingly, the antibody repertoire of individuals wintering in Concordia was more affected than the one of individuals wintering in Neumayer III. Thus, gravity changes and space radiation encountered on board the ISS do not appear to be the main environmental factors responsible for the changes in antibody repertoire previously noted in cosmonauts, underscoring the importance of physical and socio-environmental stressors.

## Results

### Antibody repertoire analysis

To evaluate the impact of these two extreme environments on the human antibody repertoire, we constructed Ig libraries using gDNA extracted from the blood of the individuals who wintered at Neumayer III or at Concordia. These libraries were subjected to high-throughput sequencing (HTS). For all individuals, blood samples were collected 2 months before departure to Antarctica (corresponding to baseline data collection, BDC), upon arrival at the station (ARR), then in April (APR), July (JUL), October (OCT) and finally in Europe, five to six months after the end of the campaign (POST) (**Figure 1A**). During wintering, individuals were exposed to different types of stressors presented in **Figure 1B**.

### Interindividual reference definition

In this longitudinal study, we did not have access to blood samples of control individuals. Consequently, we used interindividual variation determined at BDC as reference.

Interindividual variation corresponds to the variation between individuals in a normal environment. In this environment, the antibody repertoire of one individual is more stable than



that of two individuals<sup>17-19</sup>. Thus, if variations over time are higher than interindividual variation observed at BDC, we can consider that these variations are significant. To define this reference, we calculated the difference between each individual at BDC for each parameter whose variation was investigated via the calculation of dispersion indexes; this corresponded to 120 comparisons. The mean of all these comparisons was called Reference Dispersion Indexes (RDI) that were used for analyzing all parameters of the antibody repertoire. It is to note that we worked exclusively on functional sequences representing 72 -76 % of the unique sequences obtained by HTS.

### **CDR3 loops analysis**

To study the impact of wintering on Ig repertoire, we first focused our attention on amino acid composition of CDR3 loops as they are major contributors of Ig binding site. For each wintering time point of each individual, we studied both the position and the frequency of each amino acid along CDR3 of 9 to 24 AA that were expressed as dispersion indexes for each CDR3 length. These dispersion indexes were compared to the confidence interval of RDI. If dispersion indexes were within RDI confidence interval or lower (grey color in heatmaps presented in **Figures 2A and 2B**), we considered that there was no significant modification of CDR3 loops while if dispersion indexes were above RDI confidence interval, we considered that CDR3 loop composition was affected by wintering. As shown in **Figure 2A**, three profiles could be observed. Some individuals presented few or no variations as most dispersion indexes were within or below RDI confidence interval, *i.e.*, N1, N3, N6, N7, C3, C5, C6, C7 and C8. For some individuals, variations were observed exclusively at specific timepoints ARR (N8), JULY (N5 and N8) or OCT (N2). And finally, some other individuals presented variations at all time points and for all CDR3 lengths (N4, C1, C2, C4).

Given these observations, we divided individuals in two groups for each station: a group of individuals who presented no or few variations without considering the July time point corresponding to full obscurity during polar night (N1, N2, N3, N6, N7 part of the N- group; C3, C5, C6, C7, C8 part of the C- group; N- and C- indicating Neumayer and Concordia low-responders) and a group of individuals who presented important variations in July or in more time points (N4, N5, N8 part of the N+ group, C1, C2, C4 part of the C+ group, N+ and C+ indicating Neumayer and Concordia high responders). To validate the significance of these groups, we performed statistical comparisons of N- versus N+ and C- versus C+ groups at July time point. It is interesting to note that groups N+ and C+ correspond approximately to 40% of individuals as previously observed for cosmonauts<sup>9</sup>. As shown in **Figure 2C**, for most CDR3



lengths, dispersion indexes at July time point were significantly different in both comparisons thereby validating the definition of 'low and high responders' groups that were used for the following analysis.

### **IGHV, IGHD and IGHJ segments usage**

CDR3 loops are composed of the 3' -end of IGHV segments, IGHD segments, and the 5' -end of IGHJ segments. To understand why there are variations in the composition of CDR3 loops, we studied IGHV, IGHD, and IGHJ segments usage, and VDJ associations, over time for each subject in each group. As for CDR3 analysis, dispersion indexes for IGHV, IGHD, and IGHJ segments usage, or VDJ associations, were determined at each time and compared to corresponding RDI confidence intervals, and dispersion indexes above these intervals were considered significant. Analysis of IGHV segments usage revealed that all Neumayer III volunteers were below or within RDI confidence interval, and that one Concordia individual (C1 at the Post time point) was above this interval (**Figure 3**). IGHD segments usage was also below the corresponding RDI confidence interval at all time points except for two individuals (N4 of the N+ group at April and July and C4 of the C+ group at Arrival and April). Finally, IGHJ segments usage were below RDI confidence interval, except in individual N1 of the C- group at all time points. These results suggest that IGHV, IGHD and IGHJ segments usage are minimally affected by wintering in Neumayer III and Concordia.

In addition to the use of IGHV, IGHD and IGHJ segments, VDJ associations must be considered to understand why there are changes in CDR3 loops. This parameter was analyzed for associations involving the IGHV3 and IGHV4 families because it has been established that they are the most frequently used in the human antibody repertoire<sup>20,21</sup>. **Figure 3D** shows that in the N- and C- groups most VDJ association dispersion indexes were below RDI confidence interval suggesting that this parameter was not impacted in these individuals. However, in the C+ group, and to a lower extent in the N+ group, values above RDI confidence interval were frequently observed, even if no statistically significant differences were noted, suggesting modifications of VDJ associations in these two groups.

Finally, to get a clearer picture of changes we compared all parameters in N- versus N+ and C- versus C+ groups. **Figure 3E** revealed significant differences between N- and N+ at Arrival for IGHV usage and in July for IGHV and IGHD usage, and VDJ associations. Significant differences were noted between C- and C+ at Arrival, April and July for IGHV usage and for VDJ associations at all time points. These data indicate that VDJ associations were more



affected than segment usage by wintering at Concordia than by wintering at Neumayer III. Thus, changes in CDR3 mainly resulted from changes in VDJ associations in 40% of Concordia individuals.

### **Effect of wintering on the V(D)J recombination process**

As CDR3s result from the junction of three types of antibody gene segments (IGHV, IGHD, IGHJ) during V(D)J recombination, and that these junctions can be modified by RAG1/2, TdT and Artemis enzymatic activities, we wondered if these activities could be altered by wintering. To address this question, we analyzed the signatures left in Ig gDNA by RAG1/2, TdT and Artemis. During V(D)J recombination, the RAG1/2 complex cuts gDNA between gene segments and recombination signal sequences (RSS). During this process, some nt can be deleted at the 3'-end of IGHV, on both sides of IGHD and at the 5'-end of IGHJ segments. We therefore studied trimmed IGHV and IGHJ segments as well as IGHD length. After RAG1/2 action, Artemis opens coding hairpin ends resulting in the creation of palindromic sequences. Consequently, we studied the number of palindromic sequences added between the 3'-end of IGHV and the 5'-end of IGHD segments (P3VP5D) and between the 3'-end of IGHD and the 5'-end of IGHJ segments (P3DP5J). Finally, we studied the number of non-genomic nt added by the Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) at junctions between IGHV, IGHD and IGHJ segments. For these analyses, we determined dispersion indexes for each signature at each time point for each subject. These indexes were compared to corresponding RDI confidence intervals, and dispersion indexes above these RDI confidence intervals were considered significant.

Concerning RAG1/2 activity at the 3'-end of IGHV segments (**Figure 4A**), we observed that all C+ individuals were above RDI confidence interval at all time points (statistically significant differences) while this was the case only at the July time point for the N+ and N- groups. For RAG1/2 activity at 5'-end of IGHJ segments (**Figure 4B**), all C+ individuals at the April time point were statistically above the confidence interval while almost all N- and C- individuals at all time points were below this interval. An heterogeneous response, which was not statistically different from the confidence interval, was noted in the N+ group. Regarding D length (**Figure 4C**), all C+ individuals at the April, October and Post time points were statistically above the confidence interval, while again almost all N- and C- individuals at all time points were below this interval, and a non-statistically significant heterogeneous response was observed in the N+ group. The study of TdT signatures (**Figure 4D**) revealed that all C+ individuals at the April, July, October and Post time points were statistically above the confidence interval, while all N



and C- individuals at all time points were below or within this interval, and once again, a non-statistically significant heterogeneous response was observed in the N+ group. Artemis signatures were also investigated but only palindromic sequences added between 3'-IGHV and 5'-IGHD extremities were statistically above corresponding RDI confidence interval at the April and July time points in the N+ and C+ groups, respectively (**Figure S1**).

Finally, we compared all parameters in N - versus N+ and C - versus C+ groups (**Figure 4E**). These comparisons demonstrate, as expected from the analyses of individual signatures, that wintering in Concordia had a stronger effect than wintering in Neumayer III on RAG1/2 and TdT activities in 40% of the Concordia individuals. As these activities contribute to CDR3 variability, they contribute to explain why more CDR3 changes were observed during and up to five to six months after the stay in Concordia.

### **Effect of wintering on V(D)J recombination success**

Modifications of segment usages, VDJ associations, RAG1/2, and TdT activities could affect V(D)J recombination success. Three parameters can be used to study the success of *IGH* locus recombination: the amount of recombined *IGH* locus, the rate of functional sequences and IGHV replacement.

We measured the relative amount of recombined *IGH* locus in circulating B cells by semi-quantitative PCR. As shown in **Figures S2A and S2B**, no significant variation was observed during wintering in both stations. This result was confirmed by the analysis of the percentage of functional sequences (**Table 1**). As some failed recombination could be rescued by IGHV replacement corresponding to secondary recombination of previously rearranged IGHV segments requiring RAG1/2 activity<sup>22</sup>, we also studied signatures left by this process. This signature is a short stretch of nt retained at IGHVIGHD junctions. The analysis of this footprint during both wintering (**Figure S2C**) revealed that only individuals of the C+ group at the July time point were statistically above the RDI confidence interval determined for this parameter. This suggests a minor effect on IGHV replacement. Taken together, these results show that the success of *IGH* locus recombination is unlikely affected by wintering in Concordia or Neumayer III.

### **Effects of wintering on plasma immunoglobulin isotypes**

As we observed modifications in V(D)J recombination and CDR3 loops, we wondered if wintering impacted the levels of plasma immunoglobulin isotypes. Consequently, we quantified



plasma IgA, IgM and IgG subtypes in blood samples taken from our healthy individuals (otherwise the samples were not taken - see Materials and Methods section). Concerning IgM, no statistical differences were detected over time in Neumayer III ( **Figure 5A**), a statistically significant difference between the BDC and Post time points was detected for Concordia, but there were no changes in IgM level during the wintering period. For plasma IgA, whether for Neumayer III or Concordia ( **Figure 5B**), no significant changes were detected over time. Concerning IgG subtypes, no differences were detected during the wintering period (**Figure 6**), except for IgG3 for which there was a statistically significant difference between the BDC and Post time points in Concordia volunteers. Taken together, these results indicate that wintering in Concordia or Neumayer III did not impact the levels of plasma Ig isotopes.

### **Effect of wintering on cortisol level**

It is well established that stress can induce immune changes. Therefore, we quantified plasma cortisol, the major stress hormone in humans. Concerning Neumayer III ( **Figure 7A**), we observed an increase in plasma cortisol during wintering but it was not statistically significant even if some individuals (N1, N2, N4) presented higher cortisol levels during wintering in that station. In Concordia, cortisol levels were also higher throughout the wintering period but increases at Arrival, April and July were statistically significant when compared to the Post time point. We then wondered if there were differences between our groups, *i.e.*, N- vs N+ and C- vs C+ (**Figure 7B**). The N- vs N+ comparison did not reveal any differences whereas the C- vs C+ comparison showed statistical differences at Arrival and in October. Taken together, these results suggest that wintering in Neumayer III is less stressing than at Concordia and that the arrival and the end of the wintering period at Concordia are more challenging than at Neumayer III.

### **Discussion**

In this study, we investigated whether wintering in isolated and extreme environments - Antarctic scientific stations - impact the immunoglobulin heavy chain repertoire, and whether the different combinations of stress factors encountered at these stations have differential effects on this repertoire. To address this question, we analyzed Ig heavy chains of eight individuals who wintered in Neumayer III at sea level and eight individuals who wintered in Concordia at 3233 m of altitude. These analyses revealed that, like cosmonauts involved in long-term missions on the ISS<sup>9</sup>, Ig heavy chain CDR3s amino acid composition were changed in 40% of individuals. We also showed that these CDR3 changes are linked to a modification of the V(D)J



recombination process evidenced by changes of several parameters in these 40% of individuals, i.e., IGHV segment usage, VDJ associations and both RAG1/2 and TdT activities, but not to a modification of the global success of *IGH* locus recombination. Thus, these changes are qualitative but not quantitative as confirmed by the absence of change in plasma Ig isotype concentrations. These results are in accordance with our previous study of astronauts' Ig repertoire<sup>9</sup> and with the fact that 46% to 52% of astronauts came back with immune modifications, confirming that these wintering are nice analogues of the space environment<sup>2-4</sup> except for gravity changes and space radiation<sup>13,14</sup>.

CDR3 changes were observed at the July time point for 50% of individuals who wintered at Neumayer III station (which corresponds to the period of complete darkness called polar night) while changes were observed all along wintering for 40% of individuals who wintered at Concordia. This observation could be due to the fact that Concordia is a harsher environment than Neumayer III, which is extreme but not as extreme as Concordia<sup>14,23</sup>. Comparison of stresses encountered in the ISS and in these stations (**Figure 1B**) show that the main differences between ISS and Concordia environment are gravity change and radiation, suggesting that hypobaric hypoxia and socio-environmental stressors contribute to antibody repertoire alteration observed during spaceflight<sup>9</sup>. In agreement with this conclusion, it was previously shown that a model used to mimic socio-environmental stressors encountered during space missions partially affects the murine TCR  $\beta$  repertoire<sup>24</sup>. Here, a stronger effect was noted on the Ig repertoire of Concordia volunteers likely because of hypoxia which is a highly stressful condition<sup>25</sup> and has probably the most impact on over-winterers<sup>26</sup>. Even though there is an adaptation to hypoxia, the adaptation is never full. There is an elevation in ROS and oxidative stress in over-winterers with a continuous increase over time and no equilibrium between ROS production and anti-oxidative systems which could lead to several issues including immune problems<sup>26</sup>. Concordia's hypoxia is considered an acute stress, as it has a direct effect on over-winterers on arrival, but also a chronic stress, as it seems that physiological systems are unable to reach equilibrium and that, even after a long period, certain deleterious effects persist<sup>26</sup>. In accordance with this, Feurecker and colleagues observed a deregulation of the hypoxic pathway in blood cells all along wintering at Concordia, including HIF1a factor<sup>27</sup>. Interestingly, it was shown that hypoxia regulation is essential to normal B cell development and BCR editing in mouse and more precisely HIF1a activity<sup>28</sup>. In consequence, we could hypothesize that this factor was also deregulated in the bone marrow of some Concordia subjects thereby explaining, at least partially, the important Ig repertoire variations observed at this station comparatively to



Neumayer III. While Concordia subjects presented more important variations of their Ig repertoire, we also observed variations in Neumayer III volunteers but most exclusively in July which corresponds to polar night. This suggests that the disruption of the circadian rhythm could also contribute to Ig changes. The disruption of the circadian rhythm during Antarctic stays is known to be very difficult and harsh, whether at the transition between polar day to polar night, or during periods of complete light or complete darkness<sup>29</sup>. The fact that most changes happened during huge changes in circadian rhythm are not that surprising as several immune genes are under the control of circadian rhythm<sup>30</sup> and it was shown that people who did not have a normal 9 to 5 job experience changes in their immune system<sup>31</sup>.

We also noted that modifications of the Ig repertoire in the 40% of individuals who wintered at the Concordia station persisted up to 6 months after the end of the mission, as for cosmonauts<sup>9</sup>. Indeed, changes of VDJ associations, RAG1/2 and TdT activities were observed at the Post time point exclusively in the C+ group. These observations suggest that extreme environments have long-lasting effects on the antibody repertoire that are not linked to stress as cortisol returned to normal level after return. To explain this observation, we could hypothesize that DNA imprinting occurs during extreme environment exposure via epigenetic modification such as DNA methylation and histone posttranslational modifications, which are known to regulate the V(D)J recombination process<sup>32,33</sup>. In accordance with this hypothesis, we have previously shown that hypergravity affects histone H3 lysine 27 trimethylation at TCR  $\beta$  locus in murine thymocytes which could affect the V(D)J recombination process. We also observed V(D)J recombination alteration, likely due to local modifications in chromatin structure, in mice pups exposed to a model of socio-environmental stress<sup>34</sup>. Finally, the persistence of Ig repertoire alteration could perhaps contribute to explain the “allergic sensitization” of some individuals after return from Antarctica<sup>35</sup>.

As we observed alterations in Ig heavy chains, we also wondered about the effects of wintering on plasma immunoglobulin levels. Concordia and Neumayer III environments are rather pathogens-free sites or less likely to present antigens<sup>35-37</sup>. Our quantification of plasma IgM, IgA and IgG subtypes did not reveal significant changes of their levels during wintering in both stations thereby indicating that changes in CDR3s are not due to a change in plasma Ig levels. It is not surprising that these levels did not change overtime in an environment less likely to contain antigens, but this allowed us to exclude any disease that these individuals might have contracted and which could have modified CDR3s. In other confinement models like the Mars500 or Mars520 projects (extreme human isolation models of respectively 500 and 520



days), no changes were detected in the Ig levels as well<sup>3</sup>. This observation confirms that socio-environmental stresses have no impact on plasma Ig levels in the reduced presence of antigens.

## **Limitations**

We must acknowledge our study limitations as we studied a small sample size and lacked age- and sex-matched control individuals who stayed in Europe for the duration of the mission. Furthermore, we studied the antibody repertoires of only three women, which makes it impossible to draw any conclusions about potential gender-related effects. We also could have missed some unique VDJ associations corresponding to rare B-cell clones as indicated by a study that did compare data sets generated with or without amplification<sup>38</sup>. However, we are confident in our results because we previously demonstrated that the IgM CDR3 repertoire of control individuals used in our cosmonaut's study<sup>9</sup> was stable during 8-months in a normal environment thereby excluding time effect on CDR3 diversity. Furthermore, CDR3 modifications noted here are similar to those observed in cosmonauts, confirming the pertinence of the Antarctica wintering as a ground-based model to study the effects of spaceflight.

## **Conclusion and perspectives**

In conclusion, this study shows that around 40% of over-winterers in Antarctica, whether in Neumayer III or in Concordia which are ground-based analogues of the space exposome, present significant modifications of their Ig heavy chains repertoire. Individual modifications observed during wintering in Concordia, which is a harsher environment than Neumayer III, were more important and very similar to the ones induced by the space exposome, while Neumayer III is more a chronic socio-environmental stress model. Strong individual responses persisted five to six months after the return to Europe and could be due to modifications of VDJ associations and V(D)J recombination. As wintering in Concordia station affected the Ig repertoire like in cosmonauts, we can suppose that the modification of the Ig heavy chain repertoire previously noted in cosmonauts is due to physical and socioenvironmental stressors, even if we cannot exclude a contribution of microgravity and space radiation. These alterations in the antibody repertoire combined with other immune issues<sup>2,4</sup> might clinically impact the immune system. The observation of individual responses also highlights the need of personalized strategies and preventive medicine, especially during deep-space expeditions. Finally, note that these results go beyond astronauts' health, as over-winterers in both stations are not astronauts, and are relevant for biomedical research that deals with the impact of chronic stress, especially socio-environmental ones, on the immune system.



## Materials and methods

### Study Design

This longitudinal study was carried out in accordance with the World Medical Association Helsinki Declaration of 1975 (revised in 2008). The protocol was approved by the ESA Medical Board and the Ethical Committee of the Ludwig-Maximilian University (LMU), Munich, Germany (protocol number 524 -15). All subjects gave written informed consent after being informed of the aim and objectives of the project. Blood samples were collected from sixteen volunteers (thirteen men and three women) with a mean age of  $31.6 \pm 9.9$  years (mean  $\pm$  SD). Five men and three women were part of the 2021 Neumayer III wintering over campaign ( $30.4 \pm 10.7$  years), four men participated in the 2017 Concordia wintering over campaign ( $28.75 \pm 6.9$  years), and the four men were involved in the 2018 Concordia wintering over campaign ( $35 \pm 11.3$  years). There was no statistically significant difference between the age of these three groups ( $p = 0.6608$ , Kruskal-Wallis test). Fasting venous blood was collected in the morning before breakfast at six time points according to the protocol validated by ESA. These samples were taken from healthy subjects, otherwise sampling was delayed until the individual was healthy again or cancelled. Baseline data collection (BDC) took place at sea level at the European Space Research and Technology Centre (ESTEC), Noordwijk, The Netherlands, and at the Charité in Berlin, Germany, 2 months prior departure to Antarctica. During wintering over campaigns in Concordia and Neumayer III, blood samples were collected upon arrival at the station and then at regular intervals of three months (April, July and October). A last blood collection was performed in Europe five to six months after the end of the campaigns (Post time point). Blood samples, ranging from 3.4 to 6 mL, were collected in Vacutainer PPT – K2E 9 mg tubes (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) containing EDTA as anticoagulant. These tubes were centrifuged at  $1100 \times g$  during 10 minutes, then cell pellets and plasmas were directly frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . No sampling was postponed during these wintering isolations. No subject did experience previous wintering in any scientific base before. Note that we could not get access to the Post cell pellet for one subject (N5) who did winter over in Neumayer III.

### Genomic DNA extraction

Genomic DNA (gDNA) was extracted from frozen blood cell pellets using the NucleoSpin Blood L, Midi kit for DNA from blood (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The volumes of available pellets ranged from 1.7 mL to 3 mL. Thus, the protocol was adapted as follows. For a cell pellet of 2.5 mL, the pellet was resuspended and lysed using a mix containing 2.5 mL of



bovine fetal serum (Gibco, FisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA), 5 mL of the BQ1 lysis buffer, and 375  $\mu$ L of the proteinase K solution contained in the kit, followed by a 20 minutes incubation at 56°C with regular homogenization. Afterwards, 5 mL of absolute ethanol was added to the cooled sample. This mix was homogenized and 3 mL of it was placed onto two columns in two distinct tubes. The use of two columns was mandatory since the volume was too large to fit into one column. Each column with its collector tube was centrifuged at 4500xg for 3 minutes. After the first centrifugation, the rest of the sample was displayed onto the two columns followed by a centrifugation at 4500xg during 5 minutes. The columns were washed twice with 2 mL of BQ2 buffer followed by a first centrifugation at 4500xg for 2 minutes, and a second one at 4500xg for 10 minutes. gDNA was eluted by adding 200  $\mu$ L of BE buffer heated at 70 °C and incubating the columns 2 minutes at room temperature. Then, the columns were centrifuged at 4500xg for 2 minutes and gDNA in eluates was quantified using a Nanodrop 2000 (FisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA) and frozen at -80°C.

### **Design of the primers to amplify VDJ associations**

The human *IGH* locus being composed of numerous IGHV, IGHD and IGHJ segments, it was impossible to define one pair of primers to amplify all possible IGHV-IGHD-IGHJ (VDJ) associations. Thus, we designed mixes of degenerated primers that recognized one or more IGHV and IGHJ segments ( **Table S1**). Forward primers were defined in Framework (FR) regions or in leader exons of IGHV segments. Reverse primers were defined in IGHJ segments. These primers were designed to hybridize to conserved regions identified by aligning all sequences from one or several IGHV families for the forward primers, and IGHJ segments for the reverse primers. The specificity of each primer was verified by aligning them with *Homo Sapiens* genome using the V-quest Tool from IMGT<sup>39,40</sup> and the Blastn tool from NCBI<sup>41,42</sup>. To perform semi-quantitative PCR reactions, mixes of forward and reverse primers were created in various proportions determined according to the number of segments present in each family to allow the amplification of all possible VDJ associations present in genomic DNA.

### **Semi-quantitative PCR**

Semi-quantitative PCR were performed to evaluate the amount of recombined *IGH* locus in gDNA. The PCR mix was composed of 4  $\mu$ L of 5X Green GoTaq<sup>®</sup> Reaction buffer (Promega, Madison, USA), 0.4  $\mu$ L of 10 mM dNTP (ThermoScientific, Waltham, USA), 1  $\mu$ L of forward primer mix and 1  $\mu$ L of reverse primer mix at 10  $\mu$ M each, 0.1  $\mu$ L of GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (5u/ $\mu$ L) (Promega, Madison, USA) and 11.5  $\mu$ L of ultrapure water. For each sample, the



quantity of gDNA was adjusted to obtain the same amplification level of the *GAPDH* gene used as reference (*GAPDH* forward 5' -GCAGCCAGTGAAAGGGAGTC-3' and *GAPDH* reverse 5'-CCACAGGTTTCCAGGAGTGC-3'). The cycling protocol was as follows: 2 minutes at 95°C, 38 cycles (for *IGH* amplification) or 28 cycles (for *GAPDH* amplification) of 45 seconds at 95°C, 45 seconds at 62°C, 60 seconds at 72°C and finally 5 minutes at 72°C.

### **Gel migration and quantification of amplicons**

*GAPDH* amplicons were separated on a 1.5% (w/v) agarose gel prepared in TAE buffer (Tris 40 mM, acetic acid 20 mM, EDTA 1 mM) with ethidium bromide (Dominique Dutsher, Bernolsheim, France). *IGH* amplicons were separated on a 1.2% agarose gel. Gels were visualized by UV exposition using a Fusion FX7 (Vilber -Loumat, Marne-La-Vallée, France) and amplicon were quantified using ImageJ software<sup>43</sup>. Quantities of *IGH* amplicons were then normalized to those of *GAPDH* amplicons.

### **Illumina sequencing**

Libraries containing *IGHV* -*IGHD-IGHJ* (VDJ) associations were created using the LymphoTrack *IGH* Somatic Hypermutation MiSeq kit (Invivoscribe, San Diego, California, USA). To this end, 3 µL of gDNA extracted from each blood cell pellet were mixed with 45 µL of *IGH* master mix provided in the kit (this master mix contains primers with Illumina adapters that anneal to the leader of *IGHV* segments and to *IGHJ* segments) and 0.4 µL of Taq Gold DNA polymerase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). These mixes were subjected to the following cycling protocol: 7 minutes at 95°C followed by 35 cycles of 45 seconds at 95°C, 45 seconds at 60°C, 90 seconds at 72°C and finally 10 minutes at 72°C. The quantities and sizes of the amplicons were validated using the Agilent High Sensitivity DNA Assay (Agilent, Santa Clara, USA). High -throughput sequencing of libraries were conducted using the MiSeq Illumina apparatus of the gene expression analysis platform (CNRS UPR2357, Strasbourg, France) using Illumina's standard protocol. Sequences were treated using the LymphoTrack *IGH* SHM MiSeq software to retrieve complete sequences. These complete sequences were analyzed using IMGT/High V -quest software<sup>44</sup>. Obtained data were then analyzed using the software described in Buchheim et al. (2020)<sup>9</sup> to calculate the parameters needed for our study, including the analysis of CDR3 amino acids sequences. The mean number of sequences with unique CDR3 was 23 159 per sample ( **Table S2**). Sequencing data have been deposited to the NCBI Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under accession number XXXX.



## **Quantification of cortisol and antibody isotypes**

Cortisol and antibody isotypes (IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) were assessed using the Milliplex<sup>®</sup> Human Circadian/Stress Magnetic bead panel - Multiplex Assay and the Milliplex<sup>®</sup> Human Isotyping Magnetic bead panel - Isotyping Multiplex Assay (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to manufacturer's manual. These analyses were performed on plasma samples collected from the same subjects and at the same time points than blood cell pellets used to extract gDNA for high-throughput sequencing. Samples were analyzed in duplicates and concentrations were deduced from a standard curve generated using calibrators.

Concentrations were expressed as ng/mL for cortisol and as mg/dL for antibody isotypes.

## **Statistics**

### **Calculation of dispersion indexes**

In this longitudinal study, each subject is his own control. Thus, for each volunteer, changes during wintering in Antarctica were revealed by comparison with data collected prior departure for Antarctica (BDC). These changes were determined by calculating dispersion indexes for all studied parameters as previously described in Buchheim et al. (2020)<sup>9</sup>.

### **Calculation of the Reference Dispersion Index (RDI)**

To determine if dispersion indexes change during and after wintering by comparison to BDC, we calculated a Reference Dispersion Index (RDI) for each studied parameter. RDI corresponded to dispersion indexes between individuals at the BDC time point and reflected differences between individuals in a normal environment. Then, we determined the mean of RDI for each parameter and we compared this mean to dispersion indexes of each parameter at each time point for each individual in order to determine change over time.

### **Statistical analysis of data**

Statistical evaluation of the data was performed using GraphPad Prism Software (10.2.3., California, USA). Statistical differences between groups were determined using the Kolmogorov-Smirnoff test. To determine changes over time for every studied parameter, the Kolmogorov-Smirnoff test was used to compare the RDI and the dispersion indexes determined for every time point and individuals of every group. For cortisol and antibody isotypes, the Friedmann test followed by a Dunn's *post-hoc* test between each time point was used when there was no missing point; otherwise, the Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's *post-hoc*



test between each time point was used. Statistical analyses of semi-quantitative PCR data were performed using the Friedmann test followed by a Dunn's *post-hoc* test.

## References

1. Crucian, B. E. *et al.* Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions. *Front Immunol* **9**, 1437 (2018).
2. Jacob, P. *et al.* Next generation of astronauts or ESA astronaut 2.0 concept and spotlight on immunity. *npj Microgravity* **9**, 51 (2023).
3. Kimzey, S. L., Johnson, P. C., Ritzman, S. E. & Mengel, C. E. Hematology and immunology studies: the second manned Skylab mission. *Aviat Space Environ Med* **47**, 383–390 (1976).
4. Crucian, B. *et al.* Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *IJGM Volume* **9**, 383–391 (2016).
5. Frippiat, J.-P. *et al.* Towards human exploration of space: The THESEUS review series on immunology research priorities. *NPJ Microgravity* **2**, 16040 (2016).
6. Guéguinou, N. *et al.* Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J Leukoc Biol* **86**, 1027–1038 (2009).
7. Spielmann, G. *et al.* B cell homeostasis is maintained during long-duration spaceflight. *Journal of Applied Physiology* **126**, 469–476 (2019).
8. Bonnefoy, J. *et al.* B-Cell Homeostasis Is Maintained During Two Months of Head-Down Tilt Bed Rest With or Without Antioxidant Supplementation. *Front. Immunol.* **13**, 830662 (2022).
9. Buchheim, J.-I. *et al.* Plasticity of the human IgM repertoire in response to long-term spaceflight. *FASEB J* **34**, 16144–16162 (2020).



10. Fonte, C., Jacob, P., Vanet, A., Ghislin, S. & Frippiat, J.-P. Hindlimb unloading, a physiological model of microgravity, modifies the murine bone marrow IgM repertoire in a similar manner as aging but less strongly. *Immun Ageing* **20**, 64 (2023).
11. Bascove, M., Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Tschirhart, E. & Frippiat, J.-P. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J* **23**, 1607–1615 (2009).
12. Bascove, M., Guéguinou, N., Schaerlinger, B., Gauquelin-Koch, G. & Frippiat, J.-P. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J* **25**, 2947–2955 (2011).
13. Crucian, B. *et al.* Terrestrial stress analogs for spaceflight associated immune system dysregulation. *Brain, Behavior, and Immunity* **39**, 23–32 (2014).
14. Van Ombergen, A., Rossiter, A. & Ngo-Anh, T. J. ‘White Mars’— nearly two decades of biomedical research at the Antarctic Concordia station. *Exp Physiol* **106**, 6–17 (2021).
15. Pagel, J. I. & Choukèr, A. Effects of isolation and confinement on humans-implications for manned space explorations. *Journal of Applied Physiology* **120**, 1449–1457 (2016).
16. Wesche, C. *et al.* Neumayer III and Kohnen Station in Antarctica operated by the Alfred Wegener Institute. *JLSRF* **2**, A85 (2016).
17. Rodriguez, O. L. *et al.* Genetic variation in the immunoglobulin heavy chain locus shapes the human antibody repertoire. *Nat Commun* **14**, 4419 (2023).
18. Watson, C. T., Glanville, J. & Marasco, W. A. The Individual and Population Genetics of Antibody Immunity. *Trends in Immunology* **38**, 459–470 (2017).
19. Glanville, J. *et al.* Naive antibody gene-segment frequencies are heritable and unaltered by chronic lymphocyte ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 20066–20071 (2011).



20. Martin, V., Wu, Y., Kipling, D. & Dunn-Walters, D. K. Age-related aspects of human IgM<sup>+</sup> B cell heterogeneity. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1362**, 153–163 (2015).
21. Hong, B. *et al.* In-Depth Analysis of Human Neonatal and Adult IgM Antibody Repertoires. *Front. Immunol.* **9**, 128 (2018).
22. Zhang, Z., Burrows, P. D. & Cooper, M. D. The molecular basis and biological significance of VH replacement. *Immunol Rev* **197**, 231–242 (2004).
23. Ponomarev, S. *et al.* Immunological Aspects of Isolation and Confinement. *Front. Immunol.* **12**, 697435 (2021).
24. Fonte, C. *et al.* Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR- $\beta$  repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB j.* **33**, 896–908 (2019).
25. Cas, M. D. *et al.* Inside the Alterations of Circulating Metabolome in Antarctica: The Adaptation to Chronic Hypoxia. *Front. Physiol.* **13**, 819345 (2022).
26. Mrakic-Sposta, S. *et al.* Effects of Prolonged Exposure to Hypobaric Hypoxia on Oxidative Stress: Overwintering in Antarctic Concordia Station. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2022**, 1–14 (2022).
27. Feuerecker, M. *et al.* Immune sensitization during 1 year in the Antarctic high-altitude Concordia Environment. *Allergy* **74**, 64–77 (2019).
28. Burrows, N. *et al.* Dynamic regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activity is essential for normal B cell development. *Nat Immunol* **21**, 1408–1420 (2020).
29. Kawasaki, A. *et al.* Impact of long-term daylight deprivation on retinal light sensitivity, circadian rhythms and sleep during the Antarctic winter. *Sci Rep* **8**, 16185 (2018).



30. Silver, A. C., Arjona, A., Hughes, M. E., Nitabach, M. N. & Fikrig, E. Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B cells. *Brain Behav Immun* **26**, 407–413 (2012).
31. Aquino-Santos, H. C. *et al.* Chronic alteration of circadian rhythm is related to impaired lung function and immune response. *Int. J. Clin. Pract.* **74**, (2020).
32. Subrahmanyam, R. *et al.* Localized epigenetic changes induced by DH recombination restricts recombinase to DJH junctions. *Nat Immunol* **13**, 1205–1212 (2012).
33. Maman, Y., Teng, G., Seth, R., Kleinstein, S. H. & Schatz, D. G. RAG1 targeting in the genome is dominated by chromatin interactions mediated by the non-core regions of RAG1 and RAG2. *Nucleic Acids Res* **44**, 9624–9637 (2016).
34. Ghislin, S., Ouzren-Zarhloul, N., Kaminski, S. & Frippiat, J.-P. Hypergravity exposure during gestation modifies the TCR $\beta$  repertoire of newborn mice. *Sci Rep* **5**, 9318 (2015).
35. Feuerecker, M. *et al.* One Year in the Extreme Isolation of Antarctica—Is This Enough to Modulate an “Allergic” Sensitization? *Biomedicines* **10**, 448 (2022).
36. Ter Horst, R. *et al.* Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell* **167**, 1111-1124.e13 (2016).
37. Yi, B. *et al.* Influences of large sets of environmental exposures on immune responses in healthy adult men. *Sci Rep* **5**, 13367 (2015).
38. Rettig, T. A., Pecaat, M. J. & Chapes, S. K. A comparison of unamplified and massively multiplexed PCR amplification for murine antibody repertoire sequencing. *FASEB Bioadv* **1**, 6–17 (2019).
39. Brochet, X., Lefranc, M.-P. & Giudicelli, V. IMGT/VQUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* **36**, W503-508 (2008).



40. Giudicelli, V., Brochet, X. & Lefranc, M.-P. IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences. *Cold Spring Harb Protoc* **2011**, 695–715 (2011).
41. Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* **7**, 203–214 (2000).
42. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410 (1990).
43. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671–675 (2012).
44. Alamyar, E., Duroux, P., Lefranc, M.-P. & Giudicelli, V. IMGT(®) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol Biol* **882**, 569–604 (2012).

### **Authors' contributions**

A.C., S.G. and J.P.F. designed research; P.Ja., M.F., C.S. and S.G. performed research; P.J a. performed statistical analyses; A.V. conceived the software required for this project; P.J a. and S.G. analyzed data; T.H. coordinated the medical and paramedical program at Neumayer III (summer); C.D.A., C.P. and P.J o. overwintered and ran the study at the Concordia and Neumayer III bases; P.Ja., S.G. and J.P.F. wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

### **Acknowledgment**

We thank the European Space Agency (ESA ELIPS 3 and 4programs), the French (IPEV), Italian (PNRA), and German (AWI) polar institutes, the German National Space Program (DLR) and the French Space Agency (CNES). We would like to thank all Antarctic crews who have participated with great enthusiasm and professionalism in this study. We are also thankful



to the teams of the European Astronaut Centre of the European Space Agency Cologne, Germany, and to the Charité Cross Over Institute of Physiology (Profs. Gunga and Stahn) in Berlin Charité organizing and so kindly helping during the BDC sessions of Concordia and Neumayer crews, respectively. We are also grateful to the excellent help of Marion Höerl, Katharina Biere, Dr. Sandra Matzel and all other involved members from the translational research laboratory of the Department of Anesthesiology, University of Munich, Germany.

This work was supported by CNES (grants DAR 4800001108, 4800001163, and 4800001202 to JPF), the French Ministry of Higher Education and Research, the Université de Lorraine, the French State -Region Project Contract (CPER), DLR on behalf of the Federal Ministry of Economics and Technology/Energy/Climate Action (grants BMWi50WB1622. 50WB1931 and 50WB2222 to AC), ESA (ELIPS 3 and 4 and SciSpacE programs). P. J. received a Ph.D. grant from the French Ministry of Higher Education and Research.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Figure Legends**

#### **Figure 1**

*Chronology of blood sampling and comparison of stresses encountered during wintering on Concordia and Neumayer III with those encountered on the ISS.* (A) Blood samples were collected at six time points: before departure to Antarctica (Baseline Data Collection (BDC)), upon arrival at the station (ARR), then at regular interval of three months (April, July, October) and five to six months after the end of the campaign (Post). During wintering, polar night takes place between May-June and August. (B) During a stay on the ISS or wintering on Neumayer III or Concordia stations, individuals are exposed to different types of stresses, some being similar to those encountered during a space mission.

#### **Figure 2**

*Effect of wintering at Neumayer III and Concordia on immunoglobulin CDR3 region, a major component of the antibody binding site.* CDR3 amino-acid compositions were studied in 16 individuals: 8 for Neumayer III named N1 to N8 (A), and 8 for Concordia named C1 to C8 (B). These studies were performed at different time points: BDC (Baseline Data Collection) before



departure from Europe, upon arrival at the station (ARR), on April (APR), July (JUL), October (OCT) and after wintering (POST). Dispersion indexes were calculated as the difference between a time point during wintering and BDC for each individual. Both the position and the frequency of each amino acid along CDR3 of 9 to 24 AA were considered for dispersion index calculation. To estimate the impact of the wintering and of recovery, each dispersion indexes were compared to the mean of Reference Dispersion Indexes (RDI), which were defined as the difference between each individual at the BDC time point and corresponded to the normal variation between individuals in a normal environment. The differences between wintering time point and RDI were expressed as heat maps. Variations within or below the confidence interval are indicated in light grey, whereas those above, considered as statistically significant, are colored in red. The black rectangle corresponds to an unavailable sample. Values on the right indicate differences by comparison to the upper border of the confidence interval determined using BDC dispersion indexes for the 16 subjects. From these results, two groups for each station could be defined: one with a weak response (individuals presenting a heat map mainly composed of light grey which we will indicate by a minus sign) and one with a strong response (individuals presenting a heat map mainly composed of orange/red which we will indicate by a plus sign). CDR3 amino-acid composition of both groups in each station were compared, *i.e.*, N- vs N+ for Neumayer III and C- vs C+ for Concordia, at the July time point ( C). The heat map shows statistically significant differences, determined using the Kolmogorov-Smirnoff test, presented using a color code. Note that the subject N5 did not have a post point.

### Figure 3

*Effect of wintering at Neumayer III and Concordia on IGHV, IGHD and IGHJ segments usage and on VDJ associations.* Changes in IGHV ( A), IGHD ( B), IGHJ ( C) usages and VDJ associations (for the IGHV3 and IGHV4 families) ( D) during wintering were evaluated by calculating dispersion indexes. Briefly, frequencies of segments usage and VDJ associations were measured for 16 individuals (8 for Neumayer III named N1 to N8, and 8 for Concordia named C1 to C8) at different time points: BDC, arrival at the station (ARR), April (APR), July (JUL), October (OCT) and after wintering (POST). The frequencies for each segment at each wintering time point were compared to those at BDC. Then, to estimate the impact of the wintering and of recovery, each dispersion index was compared to the mean of Reference Dispersion Indexes (RDI) which were defined as the differences between each individual at BDC and corresponds to the normal variation between individuals in a normal environment. On the graphs, RDI are represented by the black lines and the corresponding intervals of



confidence are indicated by grey rectangles. Each time point for each individual are indicated by circles for Neumayer III and triangles for Concordia. As two groups for each station could be defined by CDR3 analysis, one presenting a weak response whose members are indicated in pink (minus signs above the graphs) and one presenting a strong response whose members are indicated in blue (plus signs above the graphs), these two groups have been maintained in this figure. Red lines represent the mean. Statistics were performed between the RDI and every time points of every group using the Kolmogorov -Smirnov test. Statistical results are presented as colored tables below each graph. ( **E** ) We also assessed the differences for each time point between Neumayer III (N- vs N+) and Concordia (C- vs C+) groups, without considering RDI, using the Kolmogorov -Smirnov test. Statistical results are presented as heat maps. Note that the subject N5 did not have a post point.

#### **Figure 4**

*Effect of wintering at Neumayer III and Concordia on signatures left in Ig heavy chain gDNA by the RAG1/2 complex and TdT.* The activities of the RAG1/2 complex (**A, B, C**) and TdT (**D**) were evaluated during wintering in Neumayer III (n = 8, N1 to N8, left side of the panel) and in Concordia (n = 8, C1 to C8, right side of the panel) at different time points: BDC, arrival at the station (ARR), April (APR), July (JUL), October (OCT) and after wintering (POST). We also compared these signatures between groups presenting strong (plus signs above the graphs) and weak (minus signs above the graphs) changes in CDR3 for each station at every time point (**E**). To evaluate the impact on RAG1/2 activity, we studied nucleotides (nt) deleted from 3' - IGHV (**A**) and 5'-IGHJ (**B**) extremities as well as IGHD segment lengths (**C**). We also studied the number of non-genomic nt added by TdT (**D**). For each individual, we calculated dispersion indexes for these four parameters at each time point (Arrival, April, July, October, Post) and compared these indexes to those determined at BDC. Then, to estimate the impact of the wintering and of recovery, each dispersion index was compared to the mean of Reference Dispersion Indexes (RDI) which were defined as the differences between each individual 1 at BDC and corresponds to the normal variation between individuals in a normal environment. On the graphs, RDI are represented by the black lines and the corresponding intervals of confidence are indicated by grey rectangles. Each time point for each individual are indicated by circles for Neumayer III and triangles for Concordia. Red lines represent the mean. Pink and blue points represent members presenting weak and strong CDR3 changes, respectively. Statistics were performed between the RDI and every time points of every group using the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical results are presented as colored tables below each graph.



(E) Assessment of differences for each time point between Neumayer III (N<sup>-</sup> vs N<sup>+</sup>) and Concordia (C<sup>-</sup> vs C<sup>+</sup>) groups, without considering RDI, using the Kolmogorov-Smirnoff test. Statistical results are presented as heat maps. Note that the subject N5 did not have a post point.

### Figure 5

*Effects of wintering at Neumayer III and Concordia on plasma IgM and IgA levels.* IgM (A) and IgA (B) concentrations were determined using the Luminex technology in Neumayer III (n = 8, N1 to N8, left side of the panel) and in Concordia (n = 8 for IgM, n = 7 for IgA, C1 to C8, right side of the panel) individuals before (BDC), during (Arrival, April, July and October) and after wintering (Post). Red lines represent the mean ± SD. Statistical differences were assessed using the Friedmann test followed by a Dunn's *post-hoc* test between each time point. A p value < 0.05 was considered as statistically significant. \*\*p<0.01; t = p<0.1 (tendency); ns = non-significant. Note that for C6, the IgA signal was below the detection threshold and therefore not considered in this analysis.

### Figure 6

*Effects of wintering at Neumayer III and Concordia on plasma IgG subtypes.* IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) and IgG4 (D) concentrations were determined using the Luminex technology in Neumayer III (n = 8, N1 to N8, left side of the panel) and in Concordia (n = 8, C1 to C8, right side of the panel) individuals before (BDC), during (Arrival, April, July and October) and after wintering (Post). Red lines represent the mean ± SD. Statistical differences were assessed using either the Friedmann test followed by a Dunn's *post-hoc* test between each time point when all IgG subtypes were detected or a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's *post-hoc* test when not all IgG subtypes were detected. A p value < 0.05 was considered as statistically significant. § indicates a significant difference between the Post and BDC time points. \* p<0.05; t = p<0.1 (tendency); ns = non-significant. Note that IgG2 levels were under the detection threshold in individuals N7 (April to October time points) and N8 (Post time point) and therefore not considered in this analysis.

### Figure 7

*Effects of wintering at Neumayer III and Concordia on plasma cortisol levels.* Cortisol concentrations (A) were determined using the Luminex technology in Neumayer III (n = 8, N1 to N8, left side of the panel) and in Concordia (n = 8, C1 to C8, right side of the panel) individuals before (BDC), during (Arrival, April, July and October) and after wintering (Post).



Red lines represent the mean  $\pm$  SD. Statistical differences were assessed using the Friedmann test followed by a Dunn's *post-hoc* test between each time point. A p value  $< 0.05$  was considered statistically significant. § indicates significant differences between the Arrival, April, July and Post time points. \*\*p $<0.01$ . ( **B**) Differences for each timepoint between Neumayer III (N- vs N+) and Concordia (C- vs C+) groups were assessed using the Kolmogorov-Smirnoff test. Obtained statistical results are presented as a heat map.

## Tables

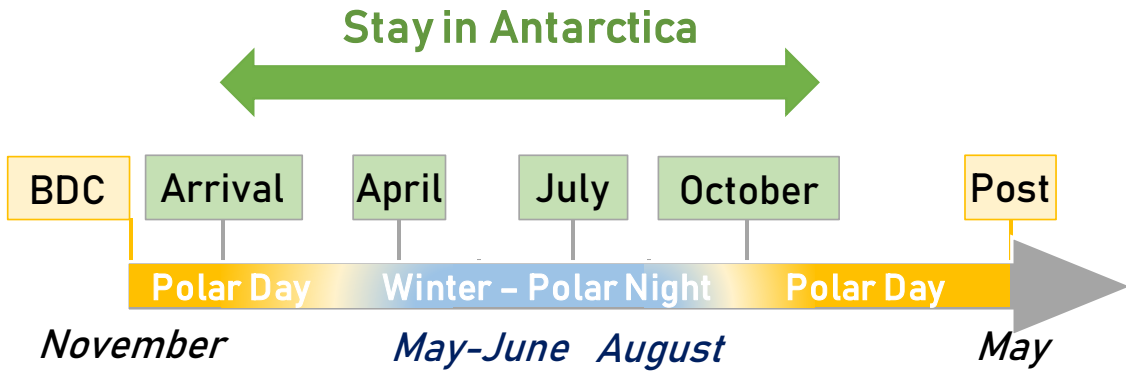
**Table 1:** Percentages of functional sequences obtained at each time point over the wintering campaigns (one Neumayer III campaign and two Concordia campaigns). Data are presented as mean  $\pm$  SD.

	BDC	Arrival	April	July	October	Post
<b>Neumayer III</b>	74% $\pm 2\%$	73% $\pm 2\%$	73% $\pm 1\%$	72% $\pm 2\%$	73% $\pm 3\%$	74% $\pm 1\%$
<b>Concordia</b>	75% $\pm 2\%$	75% $\pm 2\%$	75% $\pm 2\%$	76% $\pm 3\%$	75% $\pm 2\%$	75% $\pm 2\%$



**Figure 1**

**A.**



**B.**

		Space / ISS	Concordia	Neumayer III
<b>Physical Stresses</b>	Gravity changes	✓	✗	✗
	Radiations	✓	✗	✗
	Hypobaric hypoxia	✓	✓	✗
	Disruption of the circadian rhythm	✓	✓	✓
<b>Social-environmental stresses</b>	Extreme isolation	✓	✓	✓
	Confinement	✓	✓	✓
	Fear of failure	✓	✓	✓

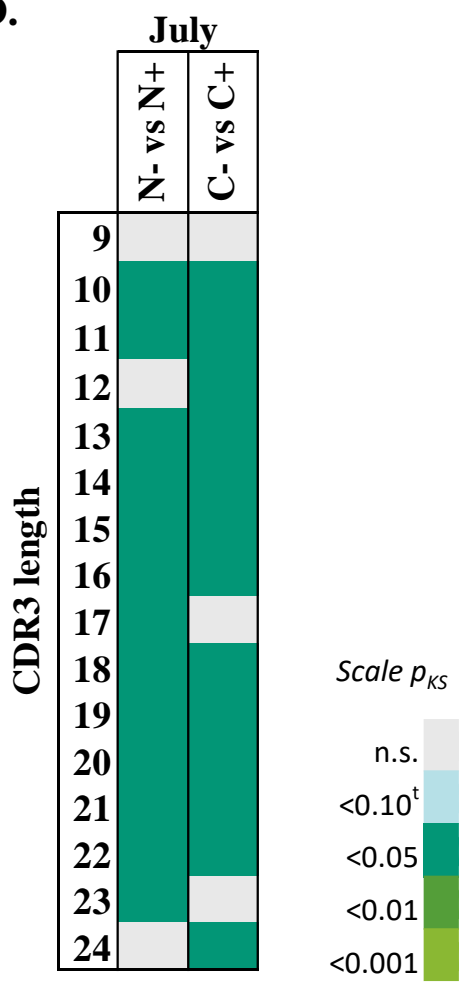






Figure 2

D.



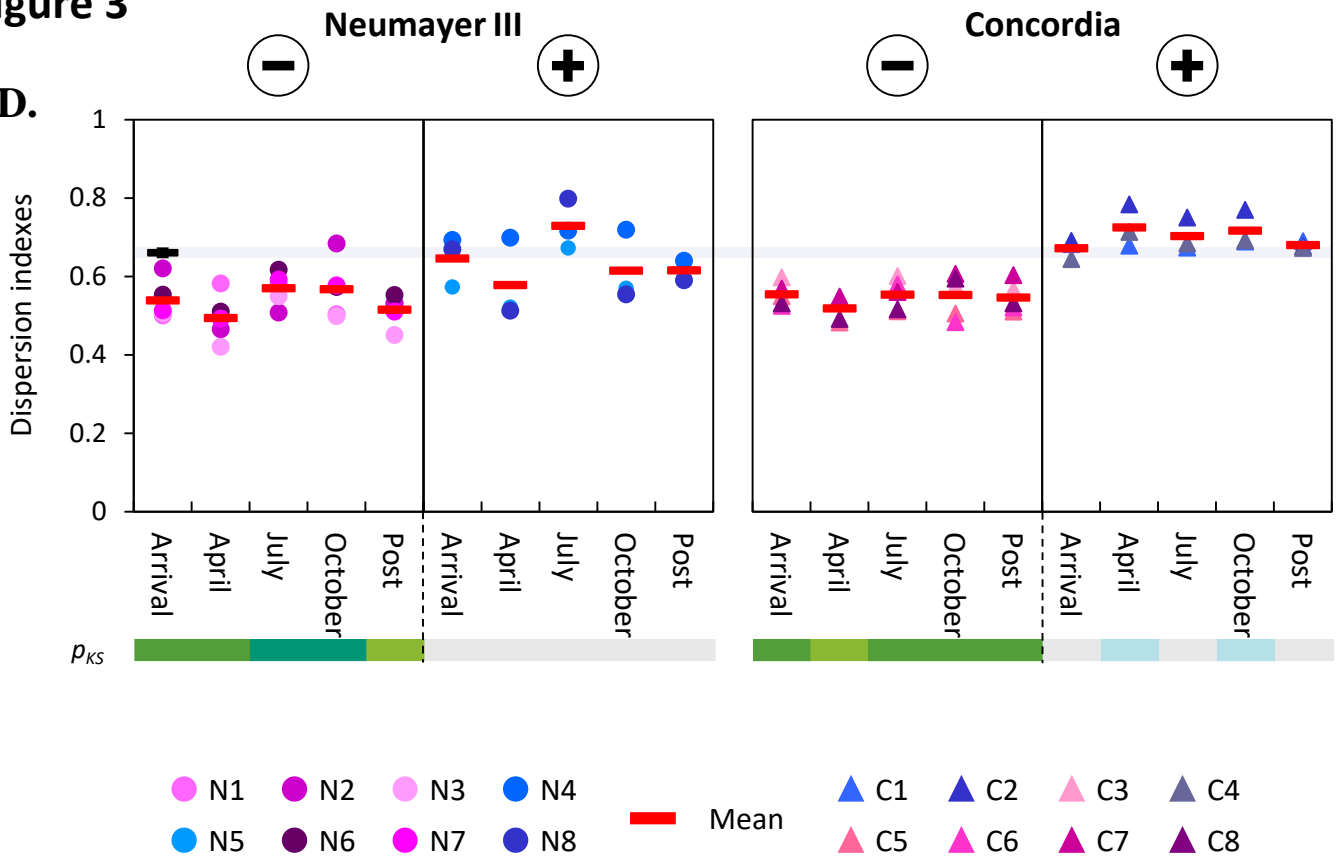






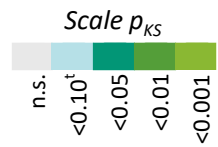
**Figure 3**

**D.**

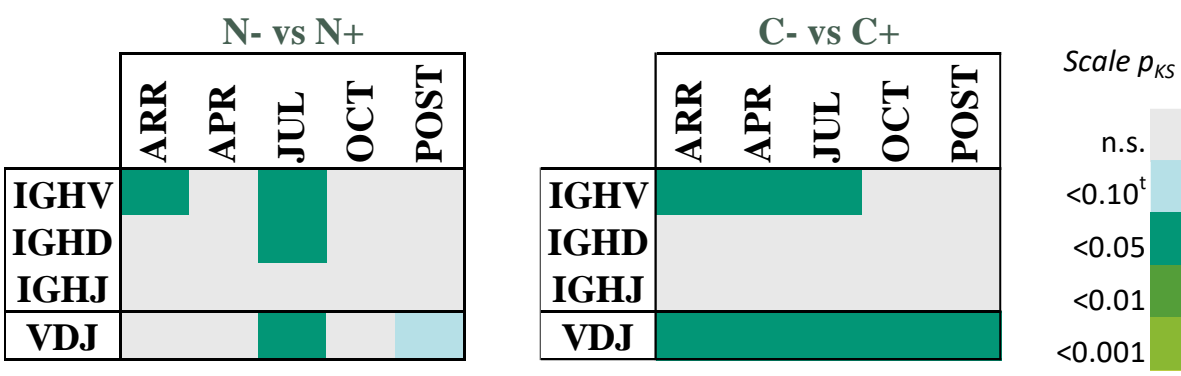


● N1   ● N2   ● N3   ● N4  
● N5   ● N6   ● N7   ● N8

— Mean    
 ▲ C1   ▲ C2   ▲ C3   ▲ C4  
▲ C5   ▲ C6   ▲ C7   ▲ C8

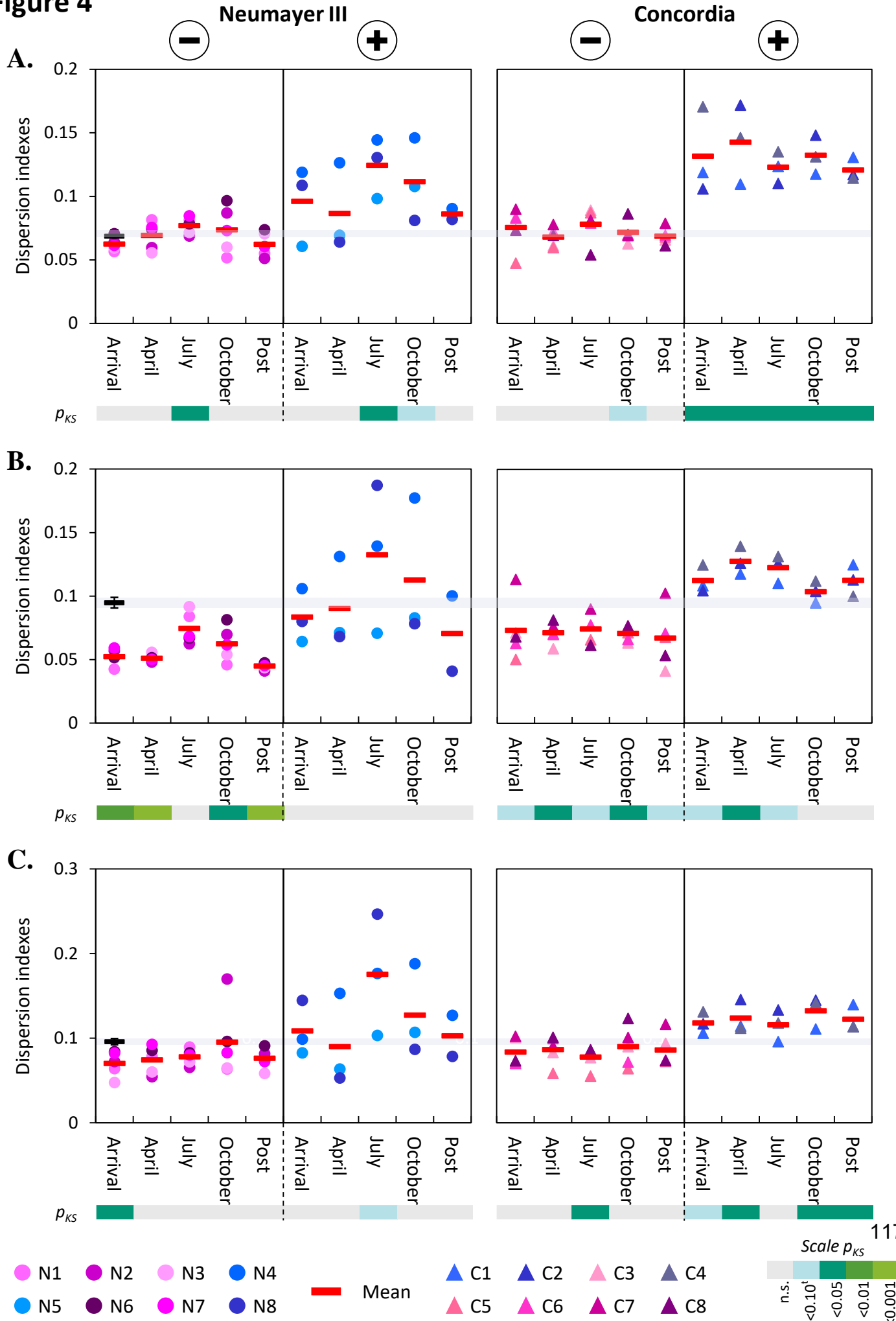


**E.**





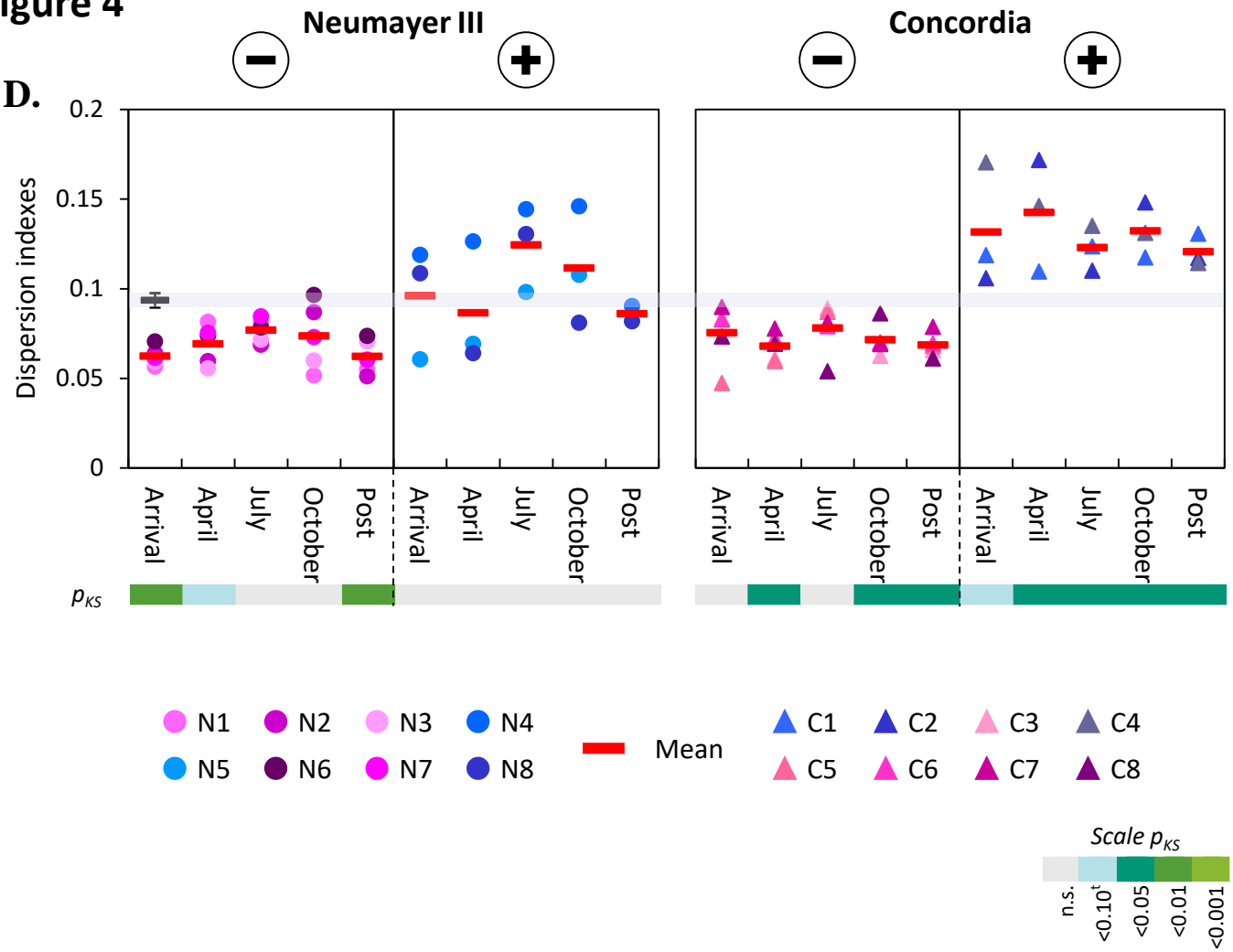
**Figure 4**



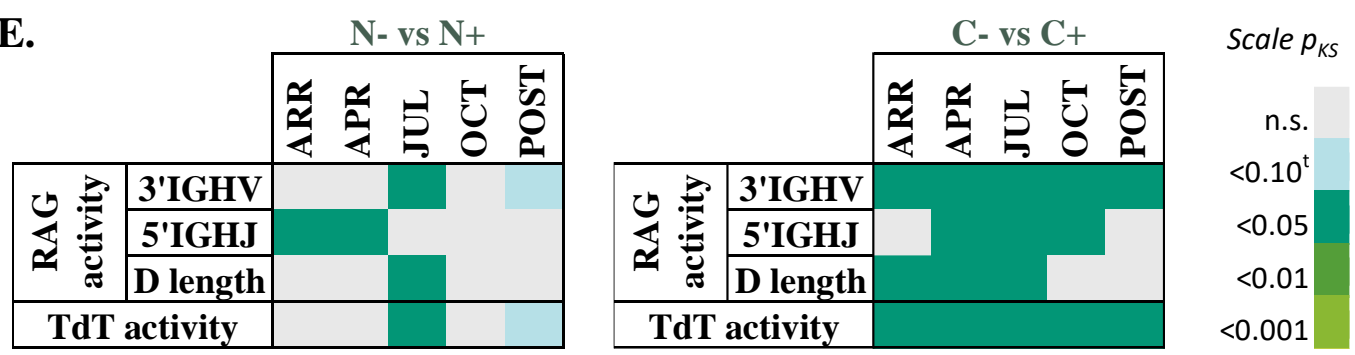


**Figure 4**

**D.**

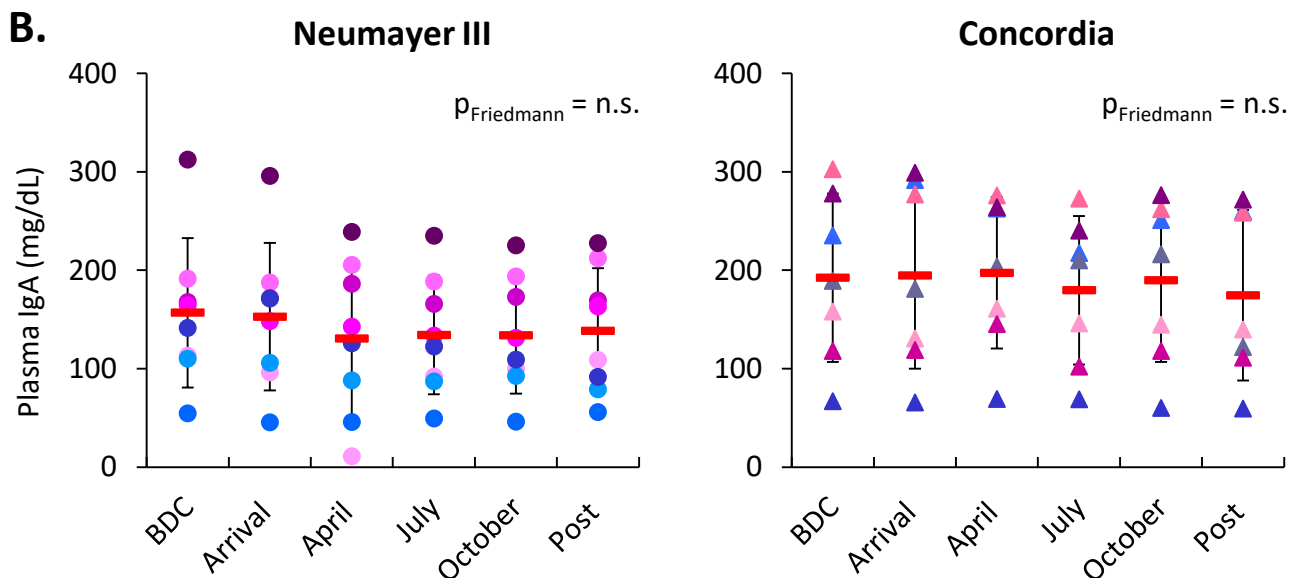
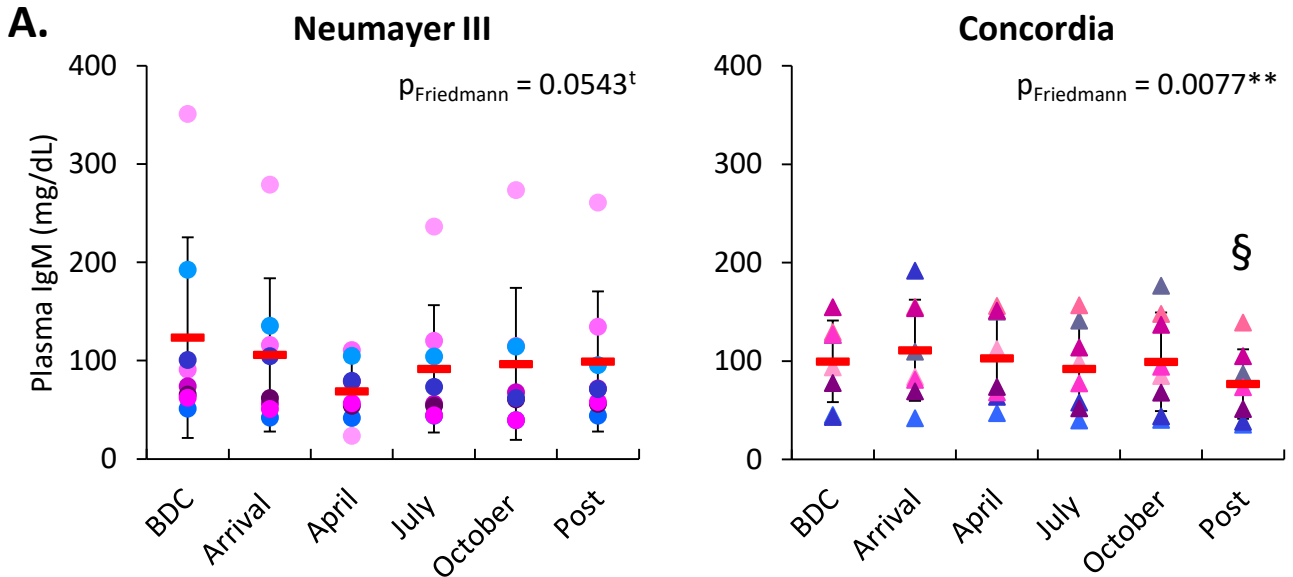


**E.**



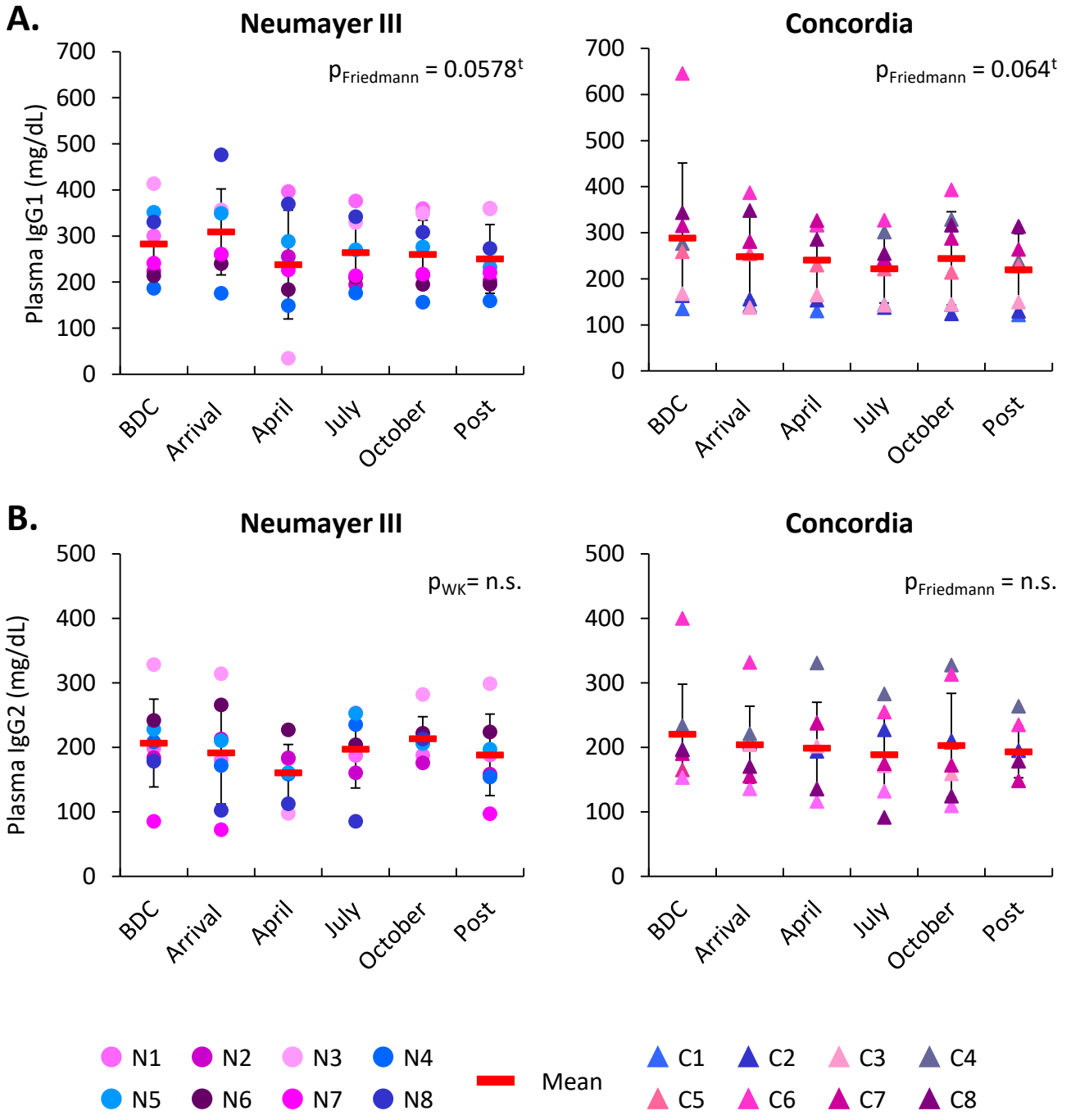


**Figure 5**



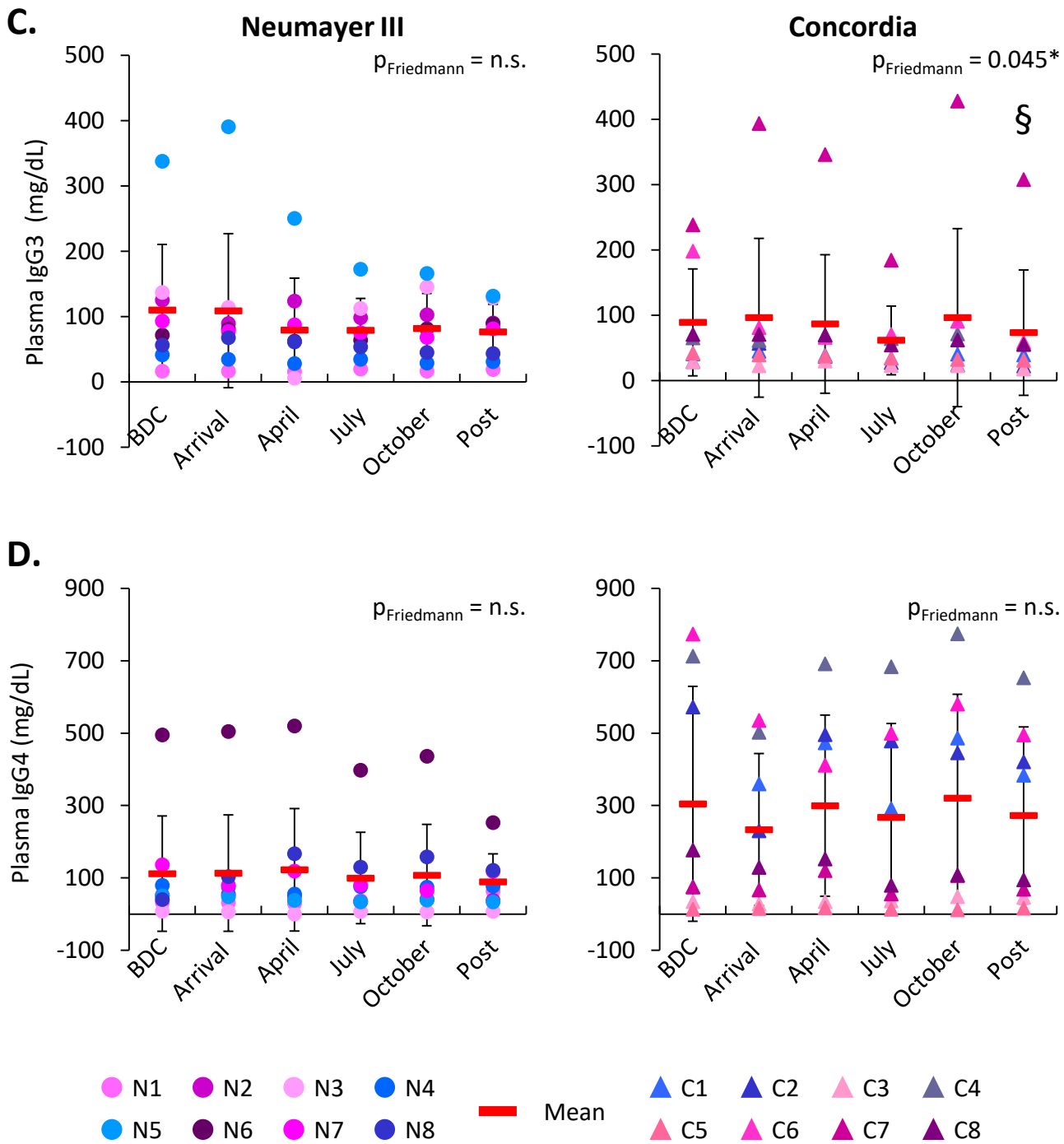


**Figure 6**





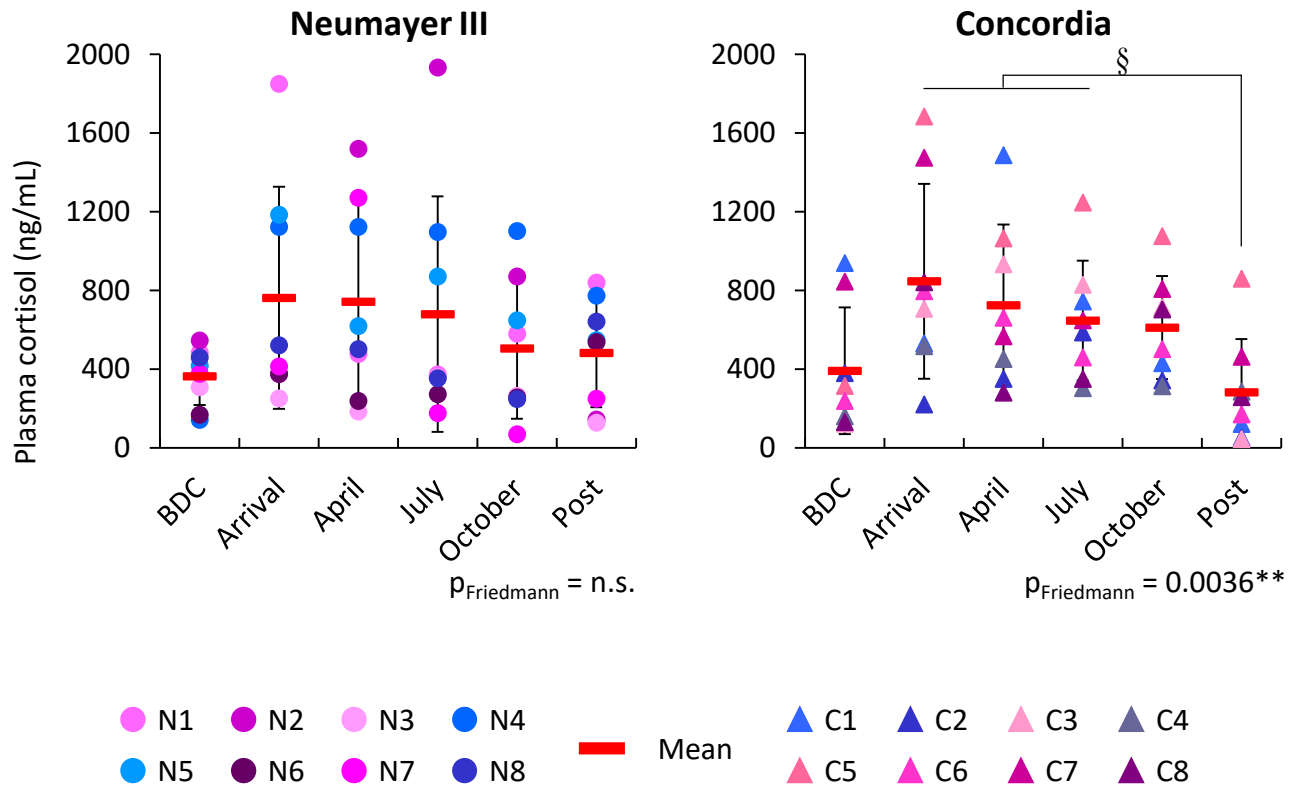
**Figure 6**



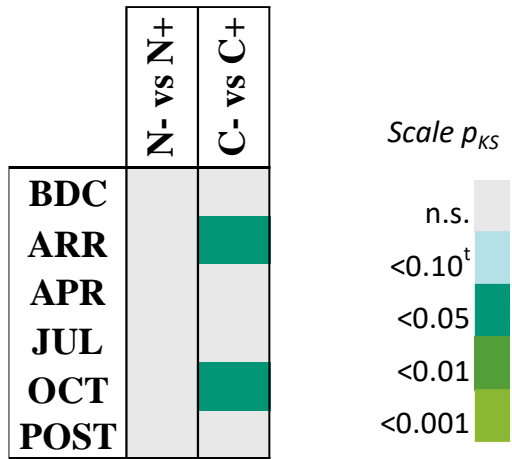


# Figure 7

**A.**



**B.**





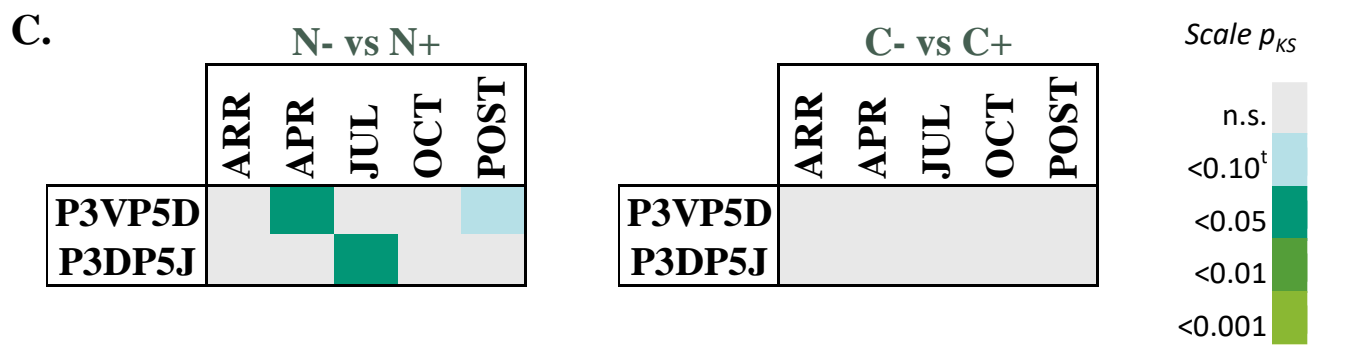
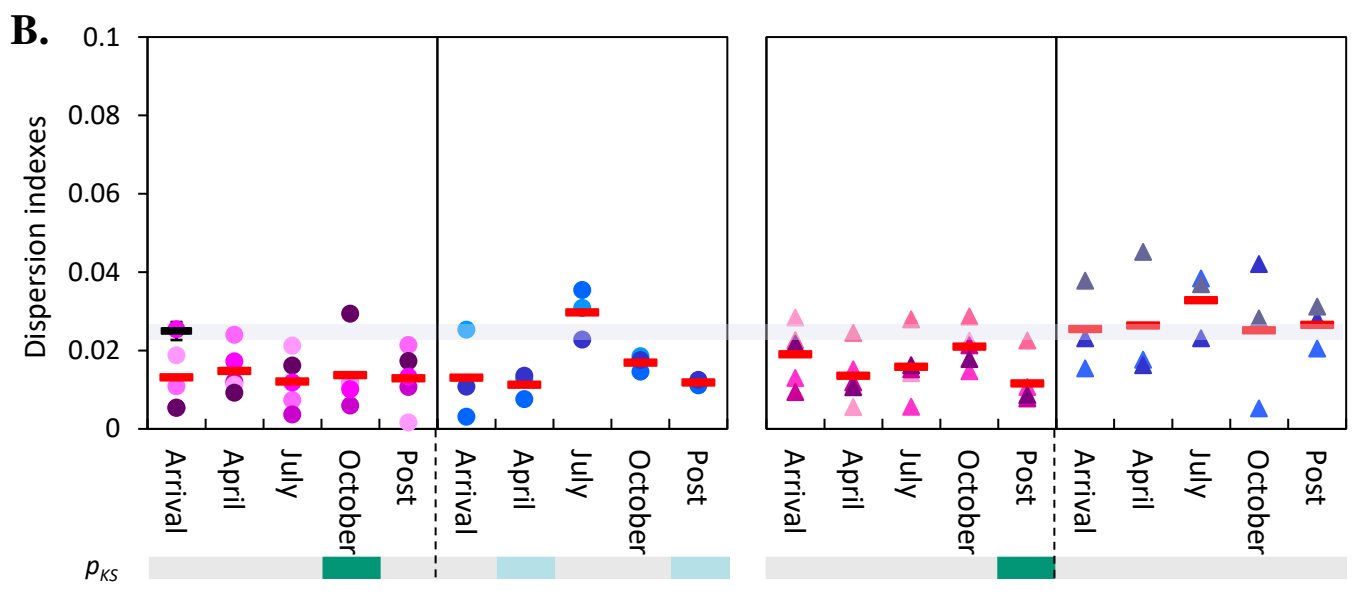
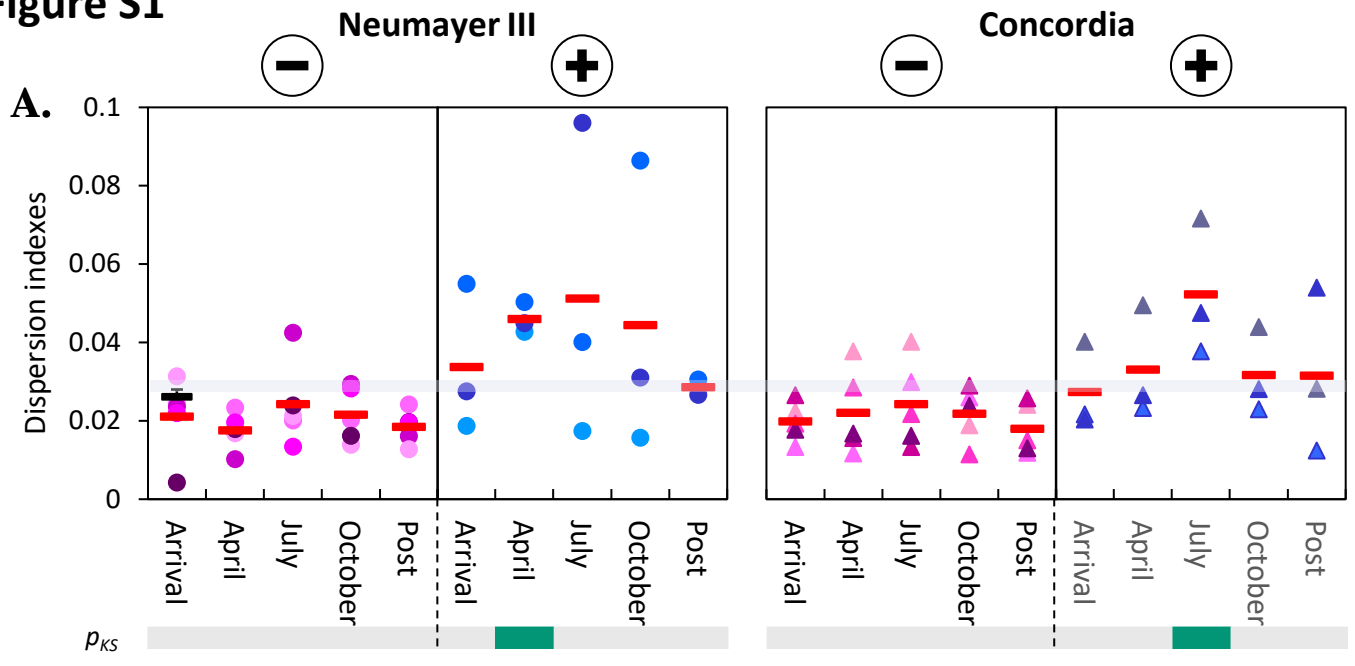
## Supplementary figures :

### Figure S1

*Effect of wintering at Neumayer III and Concordia on signatures left in Ig heavy chain gDNA by Artemis.* The activity of Artemis was evaluated during wintering in Neumayer III (n = 8, N1 to N8, left side of the panel) and in Concordia (n = 8, C1 to C8, right side of the panel) at different time points (BDC, arrival at the station, April, July, October and after wintering (Post)) by studying palindromic sequences added between 3'-IGHV and 5'-IGHD (P3VP5D) extremities (**A**) and the ones added between 3'-IGHD and 5'-IGHJ (P3DP5J) extremities (**B**). For each individual, we calculated dispersion indexes for these two parameters at each time point and compared these indexes to those determined at BDC. Then, to estimate the impact of the wintering and of recovery, each dispersion index was compared to the mean of Reference Dispersion Indexes (RDI) which were defined as the differences between each individual at BDC and corresponds to the normal variation between individuals in a normal environment. On the graphs, RDI are represented by black lines and the corresponding interval of confidence by grey rectangles. Each time point for each individual are indicated by circles for Neumayer III and triangles for Concordia. Red lines represent the mean. Subjects presenting weak (minus signs above the graphs) or strong (plus signs above the graphs) CDR3 changes are indicated in pink and blue, respectively. Statistics were performed between the RDI and every time points of every group using the Kolmogorov-Smirnoff test. Statistical results are presented as colored tables below each graph. (**C**) Assessment of differences for each time point between Neumayer III (N- vs N+) and Concordia (C- vs C+) groups, without considering RDI, using the Kolmogorov-Smirnoff test. Statistical results are presented as heat maps. Note that the subject N5 did not have a post point.



**Figure S1**



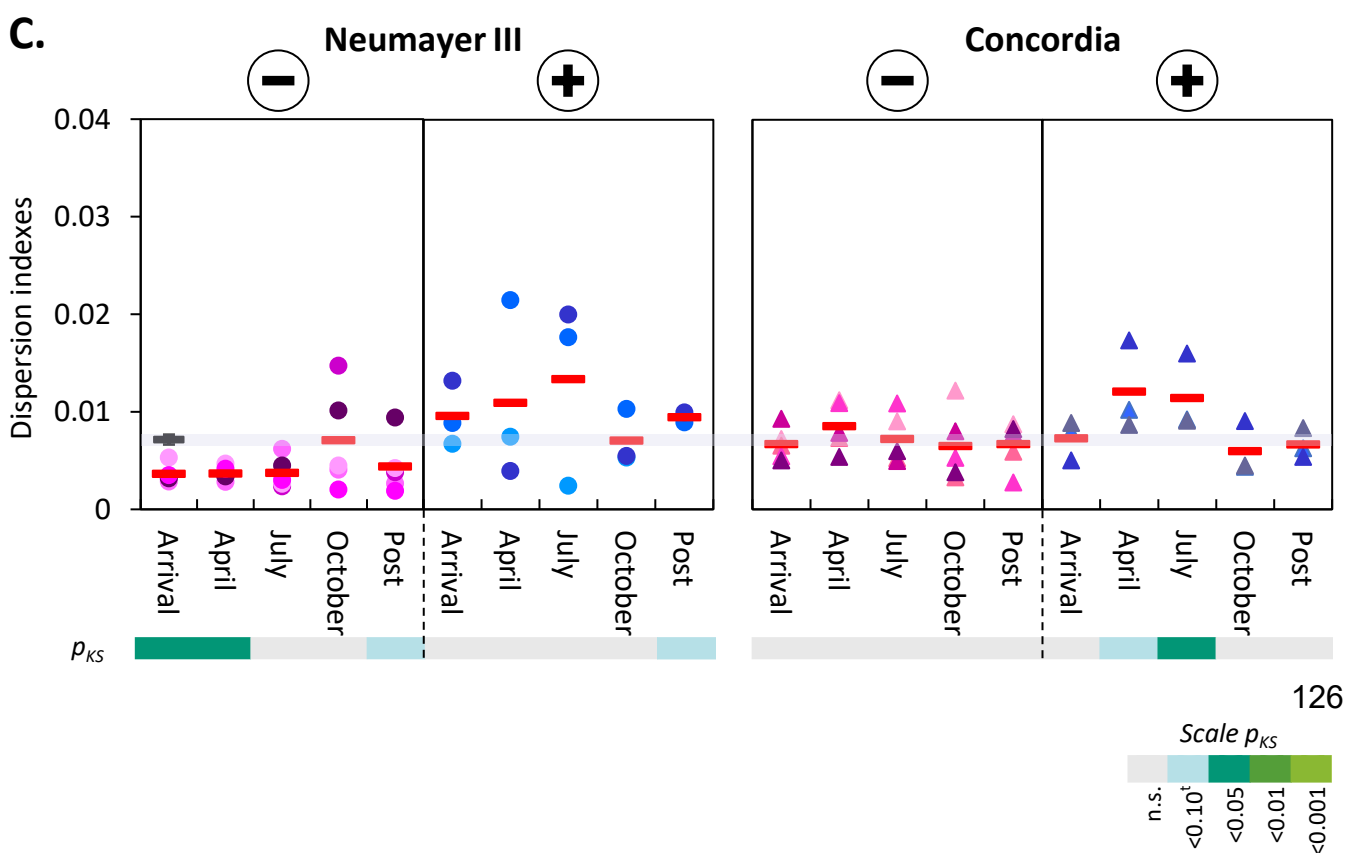
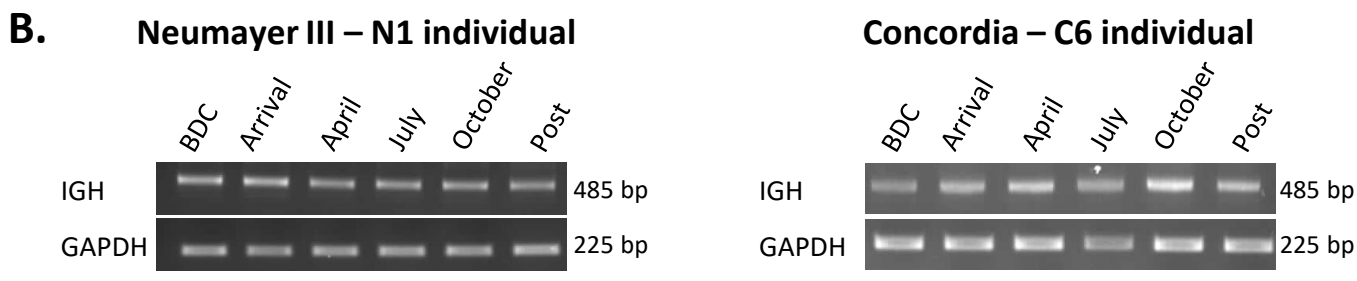
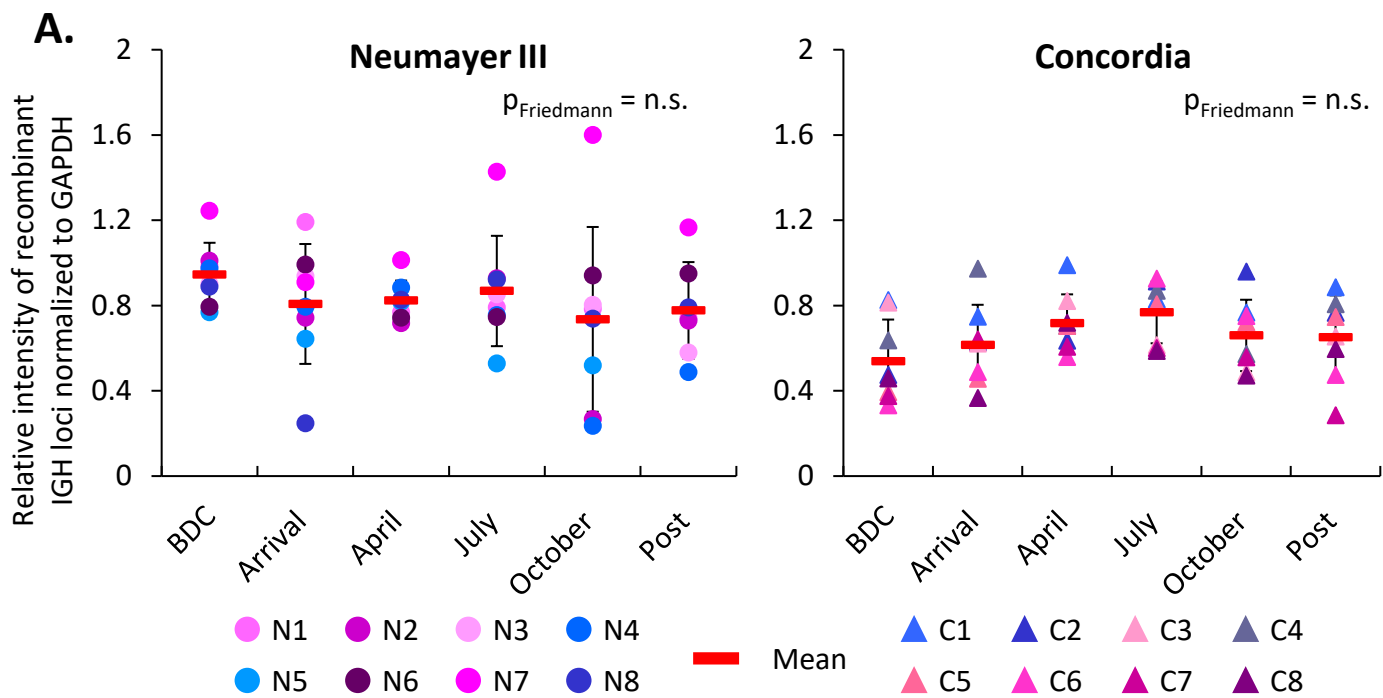


## Figure S2

*Wintering in Neumayer III and Concordia did not affect IGH locus recombination rate but had an effect on IGHV replacement.* **(A)** The recombination rate of the *IGH* locus was evaluated by semi-quantitative PCR before (BDC), during (Arrival, April, July, October) and after wintering (Post) at Neumayer III (n = 8, N1 to N8, left side of the panel) or at Concordia (n = 8, C1 to C8, right side of the panel). Semi-quantitative PCR conditions were defined to amplify only recombined *IGH* loci. The amplification of the *GAPDH* gene was used to normalize the amplification signal obtained for recombined *IGH* loci. Red lines represent the mean  $\pm$  SD. Statistical differences were assessed using the Friedmann test followed by a Dunn's *post-hoc* test. Post points were not considered for the Neumayer III analysis because subject N5 did not have a post point. n.s. = non-significant. **(B)** Examples of PCR products obtained for both *IGH* and *GAPDH* amplifications are shown for an individual who stayed in Neumayer III and for one who stayed in Concordia. **(C)** IGHV replacement footprints were evaluated at the same time points by studying footprints left in the newly generated IGHV-IGHD junctions. For each individual, we calculated dispersion indexes for this parameter at each time point and compared these indexes to those determined at BDC. Then, to estimate the impact of the wintering and of recovery, each dispersion index was compared to the mean of Reference Dispersion Indexes (RDI) which were defined as the differences between each individual at BDC and corresponds to the normal variation between individuals in a normal environment. On the graphs, RDI are represented by black lines and the corresponding interval of confidence by grey rectangles. Each time points for each individual are indicated by circles for Neumayer III and triangles for Concordia. Red lines represent the mean. Subjects presenting weak (minus signs above the graphs) or strong (plus signs above the graphs) CDR3 changes are indicated in pink and blue, respectively. Statistics were performed between the RDI and every time points of every group using the Kolmogorov-Smirnoff test. Statistical results are presented as colored tables below each graph. Note that the subject N5 did not have a post point.



**Figure S2**





**Table S1:** Primers used to quantify the amount of recombined *IGH* locus by semi-quantitative PCR and composition of the mixes of *IGHV* and *IGHJ* primers.

<i>IGH</i> segment target	Sequence (5'-3')	Percentage of each primer into the mix
<i>IGHV primer mix</i>		
<i>IGHV1 + IGHV7</i>	ATGGACTGGACCTGGAGG	20%
<i>IGHV2</i>	TCMTGTGAGTGCTGTGGT	2.5%
<i>IGHV3</i>	GCTGGHTTTTCCTTG YTGC	50%
<i>IGHV4</i>	SCTGGTGGCRGCTCCCAGA	20%
<i>IGHV5</i>	TCCTGGCTGTTCTCCAAGGT	5%
<i>IGHV6</i>	TCTGTCTCCTTCCTCATCTTC	2.5%
<i>IGHJ primer mix</i>		
<i>IGHJ1 + IGHJ3 + IGHJ4 + IGHJ5</i>	TGGTCACCGTCTCCTCAG	70%
<i>IGHJ2</i>	TGGTCACTGTCTCCTCAG	3%
<i>IGHJ6</i>	CGGTCACCGTCTCCTCAG	27%

**Table S2:** Numbers of unique CDR3 sequences obtained at each time point over the wintering campaigns (one Neumayer III campaign and two Concordia campaigns). Data are presented as mean  $\pm$  SD.

BDC	Arrival	April	July	October	Post
25459 $\pm$ 7126	23634 $\pm$ 6039	22091 $\pm$ 6645	20941 $\pm$ 5071	21419 $\pm$ 5261	25410 $\pm$ 6142



## Objectif 2 : Utilisation des biomarqueurs NLR, GLR et PLR pour évaluer le statut immunitaire et de santé dans différents modèles d'études

### III. Intérêt des ratios NLR, GLR et PLR dans un modèle de microgravité simulée, le head-down tilt bed-rest

Avec l'augmentation de la durée et du nombre de vols spatiaux, il apparaît crucial de développer des outils permettant de suivre l'état de santé des voyageurs spatiaux et de déterminer quand des contre-mesures doivent être appliquées. En effet, l'exposome spatial affecte tous les systèmes physiologiques dont certains effets, notamment au niveau du SI, persistent après le retour de mission (Buchheim et al., 2020; Jacob et al., 2023). Ces impacts délétères sur le SI peuvent compromettre la défense de l'hôte contre les infections, les toxines, les cancers et ainsi menacer les objectifs des futures missions lunaires et martiennes. En effet, près de la moitié des astronautes reviennent avec des modifications immunologiques qui touchent le SI inné et le SI adaptatif (Crucian et al., 2008), il apparaît donc crucial de monitorer l'état immunitaire et de fait l'état de santé des astronautes.

Les ratios NLR et PLR sont des biomarqueurs de nombreuses pathologies infectieuses, cardio-vasculaires, auto-immunes et de cancers qui sont toutes de potentielles complications associées aux vols spatiaux (Demirdal and Sen, 2018; Fu et al., 2015; Isaac et al., 2016; Wu et al., 2016). Ce sont des biomarqueurs faciles à mettre en place, compréhensibles et peu onéreux. Une étude récente a mis en évidence l'intérêt du NLR comme potentiel biomarqueur du statut immunitaire chez 23 astronautes et chez des souris soumises au modèle HU pendant 14 et 30 jours (Paul et al., 2020). Étant donné la difficulté d'accéder à des échantillons provenant d'astronautes et les limitations dans les protocoles d'expérimentation, nous nous sommes intéressés au modèle HDTBR de microgravité simulé. L'objectif de cette étude était de confirmer la pertinence des ratios NLR et GLR et d'évaluer l'intérêt du ratio PLR. Nous avons évalué ces trois biomarqueurs sur un nombre significatif d'individus ( $n = 20$ ) et suivi leur évolution avant, pendant et après l'HDTBR. Ainsi, nous avons confirmé la pertinence des ratios NLR et GLR dans un modèle d'HDTBR, et identifié un nouveau biomarqueur d'intérêt : le ratio PLR. De plus, la cinétique de ces ratios était similaire à celle observés chez les astronautes.



### **Article 3:**

Long-duration head-down tilt bed rest confirms the relevance of the neutrophil to lymphocyte ratio and suggests coupling it with the platelet to lymphocyte ratio to monitor the immune health of astronauts

Pauline Jacob, Julie Bonnefoy, Stéphanie Ghislin, and Jean-Pol Fripiat

*Frontiers in immunology vol. 13 952928. 13 Oct. 2022*





## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Amber M Paul,  
Embry–Riddle Aeronautical University,  
United States

## REVIEWED BY

Ana Romero-Weaver,  
University of Florida, United States  
Jaden Hastings,  
NewYork-Presbyterian, United States  
Sulekha Anand,  
San Jose State University,  
United States

## \*CORRESPONDENCE

Jean-Pol Fripiat  
jean-pol.fripiat@univ-lorraine.fr

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Multiple Sclerosis  
and Neuroimmunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

RECEIVED 25 May 2022

ACCEPTED 29 September 2022

PUBLISHED 13 October 2022

## CITATION

Jacob P, Bonnefoy J, Ghislin S and  
Fripiat J-P (2022) Long-duration  
head-down tilt bed rest confirms the  
relevance of the neutrophil to  
lymphocyte ratio and suggests  
coupling it with the platelet to  
lymphocyte ratio to monitor the  
immune health of astronauts.  
*Front. Immunol.* 13:952928.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.952928

## COPYRIGHT

© 2022 Jacob, Bonnefoy, Ghislin and  
Fripiat. This is an open-access article  
distributed under the terms of the  
[Creative Commons Attribution License  
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is  
permitted, provided the original author  
(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original  
publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic  
practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# Long-duration head-down tilt bed rest confirms the relevance of the neutrophil to lymphocyte ratio and suggests coupling it with the platelet to lymphocyte ratio to monitor the immune health of astronauts

Pauline Jacob, Julie Bonnefoy, Stéphanie Ghislin  
and Jean-Pol Fripiat\*

Stress Immunity Pathogens Laboratory, UR 7300 SIMPA, Faculty of Medicine, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

The identification of safe and easily-determined-inflight biomarkers to monitor the immune system of astronauts is mandatory to ensure their well-being and the success of the missions. In this report, we evaluated the relevance of two biomarkers whose determination could be easily implemented in a spacecraft in the near future by using bedridden volunteers as a ground-based model of the microgravity of spaceflight. Our data confirm the relevance of the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and suggest platelet to lymphocyte ratio (PLR) monitoring to assess long-lasting immune diseases. We recommend coupling these ratios to other biomarkers, such as the quantification of cytokines and viral load measurements, to efficiently detect immune dysfunction, determine when countermeasures should be applied to promote immune recovery, prevent the development of disease, and track responses to treatment.

## KEYWORDS

head-down tilt bed rest, neutrophil/lymphocyte ratio (NLR), platelet/lymphocyte ratio (PLR), biomarker, spaceflight, inflammation, autoimmunity



## Introduction

Spaceflight is an extreme environment that threatens the health of astronauts. Indeed, numerous organ systems are altered by the space exposome, which comprises a multitude of unique stressors such as microgravity, radiation, isolation, confinement, disruption of sleep and circadian rhythms, high performance expectations, and risk of equipment failure or fatal accidents. Among affected biological systems, it is now well established that the space exposome induces immune system alterations that persist after return (1–3). These detrimental impacts on the immune system could compromise the defense against infections, toxins and cancer and consequently threaten the mission's objectives. Indeed, it has been demonstrated that the immune system of approximately half of the astronauts who spent six months on the ISS is sensitive to spaceflight conditions (4).

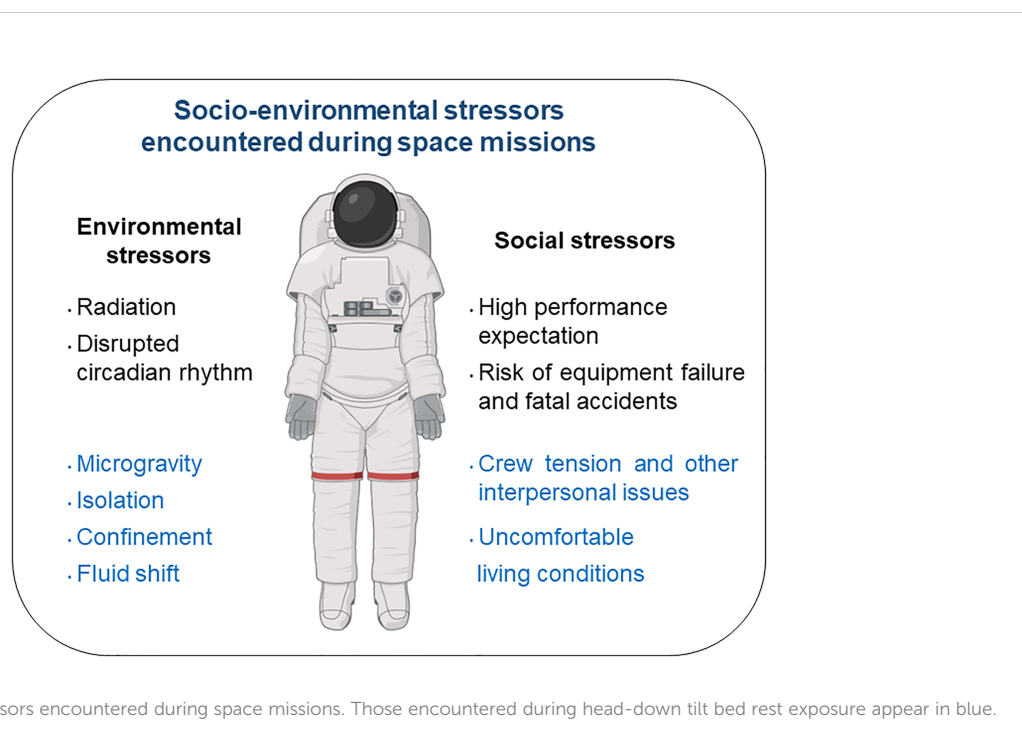
Among immune disturbances that have been reported, several reports have indicated that spaceflight increases systemic inflammatory status. The analysis of plasma samples collected in flight in 28 astronauts participating in long-duration ISS missions revealed persistent low-grade systemic inflammation characterized by increased TNF $\alpha$  and IL-1RA plasma concentrations (5). This increase in proinflammatory cytokines was confirmed in 12 cosmonauts (6) and by a study of 14 previously uninvestigated cytokines in 13 astronauts participating in long-duration missions (7). Since persistent low-grade inflammation can lead to various diseases (8, 9), its monitoring appears crucial.

Given the limitations in the availability and the experimental protocols that can be performed with samples from astronauts,

several ground-based models have been developed to mimic the effects of spaceflight. Among them, head-down tilt bed rest is the best and most integrated Earth-based analog of the microgravity of spaceflight (10) (see Figure 1 presenting socio-environmental stressors present both during space missions and head-down tilt bed rest exposures). In a recent paper, Bonnefoy et al. (11) showed that, contrary to spaceflight, two months of head-down tilt bed rest seemed to lower the systemic inflammatory status in 20 healthy male volunteers. This hypothesis was supported by an increase in serum cortisone.

The neutrophil to lymphocyte (NLR) and platelet to lymphocyte (PLR) ratios are useful, inexpensive and readily available predictive biomarkers for several inflammatory, autoimmune, infectious and cardiovascular diseases and various types of cancer (12–17), all of which are potential complications associated with space missions (1, 2, 18, 19). Interestingly, a recent study suggested NLR as a biomarker for future in-flight immune health monitoring (20). Consequently, we investigated in a group of 20 healthy male volunteers whether NLR and PLR are affected by 60 days of head-down tilt bed rest to confirm the relevance of these ratios as biomarkers of human immune system function during space missions. Indeed, such biomarkers, coupled with innovative technologies to monitor health and perform personalized diagnosis and medical intervention, are needed to ensure safe space exploration.

Our data confirm the relevance of NLR to monitor immune health during space missions and suggest that PLR monitoring could be used to assess long-lasting immune diseases.





## Materials and methods

### Subjects and ethics statement

Twenty healthy male volunteers (age:  $34 \pm 8$ ; height:  $176 \pm 5$  cm; weight:  $73.5 \pm 6.1$  kg) were recruited for this exploratory longitudinal study. As indicated in Bonnefoy et al. (11), these subjects had no medical history or physical signs of disease. All were nonsmokers, healthy and not taking any drugs or medications. The head-down tilt bed rest protocol included 16 scientific protocols conducted in parallel and complied with the ethical standards of the 1964 Declaration of Helsinki. Protocols were approved (ClinicalTrial.gov database number NCT03594799) by the Institutional Review Board of the "Comité de Protection des Personnes Sud Ouest et Outre Mer I" (number ID RCB: 2016-A00401-50). All subjects gave their written informed consent before they started the study.

### Study design

This 2-month head-down tilt bed rest study, coordinated by the European and French National Space Agencies, was conducted at the Space Clinic of the Institute of Space Medicine and Physiology in Toulouse, France. It was originally designed to evaluate the efficiency of dietary supplementation with a cocktail of antioxidant substances. However, independent studies carried out on these subjects demonstrated that this supplementation had no effect on B-cell homeostasis (11), biomarkers of calcium homeostasis, bone formation and resorption (21), lumbar vertebral fat fraction (22), hemolysis and CO elimination (23), muscle deconditioning, oxidative damage, mitochondrial content and protein balance (24), neurobehavior (25), cardiac circadian rhythm (26) or adipose tissue immunometabolism (27). Therefore, individuals from the supplemented and non-supplemented groups could be pooled, allowing access to a group of 20 participants, which is quite a large group to have experienced long-duration head-down tilt bed rest.

From a practical point of view, this head-down tilt bed rest study was divided into two campaigns. In each campaign, 10 participants were randomly assigned to two groups in a double-blinded manner. Five of the participants were part of the non-supplemented group which did not receive the antioxidant cocktail during head-down tilt bed rest, whereas the five others were part of the supplemented group which received the antioxidant cocktail daily during head-down tilt bed rest. Details about the composition of the antioxidant cocktail as well as nutritional aspects monitored during this study can be found in Bonnefoy et al. (11). Each campaign consisted of a 2-month head-down tilt bed rest period (HDTBR) with a 14-day baseline data collection period (BDC) before HDTBR and a 14-

day recovery (R) period after HDTBR. During HDTBR, subjects lay in a supine position with a  $-6^\circ$  tilt to preserve simulated microgravity effects. All protocols and activities, including weighing and showering, were performed in a  $6^\circ$  head-down tilt position. The recovery period included a physical rehabilitation program tailored to each volunteer.

### NLR, GLR and PLR determination

Fasting venous blood was collected within 30 min after waking before other scientific protocols and several days after potentially traumatic procedures required by other participating teams (e.g., muscle biopsies). Neutrophils, granulocytes, platelets and lymphocytes were quantified four days before head-down tilt bed rest exposure (BDC-4), after 20, 49 and 60 days of head-down tilt bed rest (HDTBR20, HDTBR49 and HDTBR60, respectively), and 1, 13 and 60 days after the end of head-down tilt bed rest (R+1, R+13 and R+60, respectively) from blood samples collected in EDTA by the LaboSud Garonne laboratory (Accreditation 31 002 325 4, Labège, France) using SYSMEX XN9100 (SYSMEX, Roissy, France). NLR, GLR and PLR were calculated using neutrophil, granulocyte, platelet and lymphocyte levels in the complete blood count measurement.

### Statistics

NLR, GLR and PLR data were first analyzed for the statistical significance of the effects of dietary supplementation during head-down tilt bed rest with a repeated-measures two-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction in combination with *post hoc* Sidak's multiple comparison testing or, when data points were missing, with a Geisser-Greenhouse corrected linear mixed effects model using the restricted maximum likelihood method in combination with *post hoc* Sidak's multiple comparison testing (GraphPad Prism 9.0). As no statistical significance was identified between supplemented and non-supplemented volunteers, pooled data for all volunteers per time point were analyzed for the statistical significance of the effects of head-down tilt bed rest and test days using a repeated-measures one-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction in combination with *post hoc* Tukey multiple comparison testing or, when data points were missing, with a Geisser-Greenhouse corrected linear mixed effects model using the restricted maximum likelihood method in combination with *post hoc* Tukey multiple comparison testing (GraphPad Prism 9.0). No outliers were identified or removed. Information on age, height and weight was not considered because these parameters were not different between the supplemented and non-supplemented groups. An adjusted P value  $< 0.05$  was considered statistically significant.



## Results

All participants completed the 60 days of head-down tilt bed rest, but three dropped out at R+60 during follow-up.

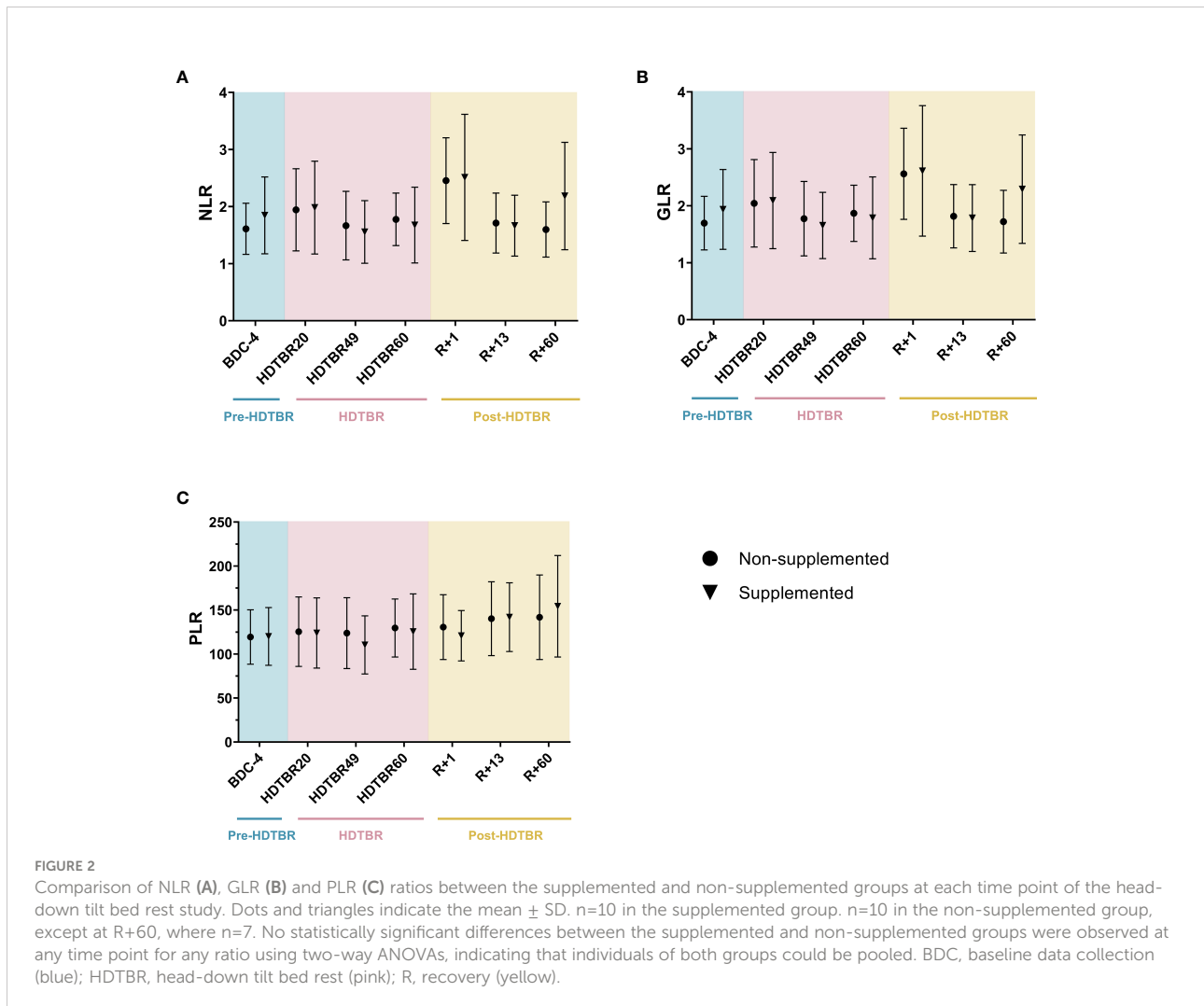
### NLR, GLR and PLR are not affected by dietary supplementation

To confirm the non-effectiveness of the antioxidant supplementation used during this head-down tilt bed rest study, as mentioned above, we checked that NLR, GLR and PLR values were not significantly different between the supplemented and non-supplemented groups. Figure 2 shows that none of these ratios were significantly different between the groups at each investigated time point. Thus, as expected, individuals from the supplemented and non-supplemented

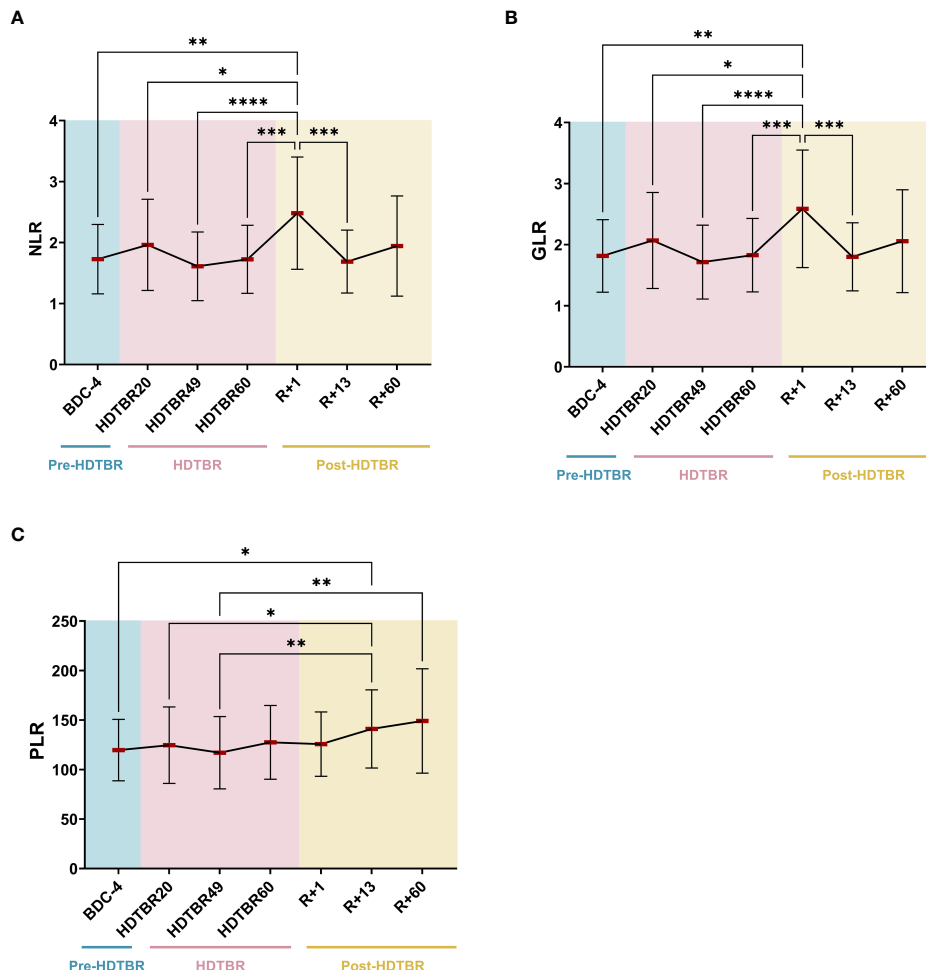
groups could be pooled, thereby giving us access to a large group having undergone long-duration head-down tilt bed rest.

### Effects of head-down tilt bed rest on NLR, GLR and PLR

Significant increases in NLR and GLR were noted at R+1. These ratios were increased by  $50 \pm 49\%$  (mean  $\pm$  SD) ( $p < 0.01$ ) and  $48 \pm 47\%$  ( $p < 0.01$ ) at R+1 compared to BDC-4, respectively (Figure 3). Then, NLR and GLR ratios decreased at R+13 to reach a mean value similar to the one observed at BDC-4. The very similar evolution of NLR and GLR in this study occurs because basophil and eosinophil levels are low in peripheral blood in comparison to neutrophil levels, which represent 50-70% of the total leukocyte population. Regarding PLR, we noted that it gradually increased after head-down tilt bed rest. It increased by  $20 \pm 23\%$  ( $p < 0.05$ ) at R+13 compared to BDC-4







**FIGURE 3**  
 Evolution of NLR (A), GLR (B) and PLR (C) ratios before, during and after two months of head-down tilt bed rest. As no statistically significant differences between the supplemented and non-supplemented groups were observed (Figure 2), individuals of both groups were pooled. n=20, except at R+60, where n=17. Horizontal bars indicate the mean. Statistically significant differences were revealed using either one-way ANOVA or a linear mixed effects model analysis. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001. BDC, baseline data collection (blue); HDTBR, head-down tilt bed rest (pink); R, recovery (yellow).

and by  $32 \pm 22\%$  ( $p<0.01$ ) at R+60 compared to HDTBR49. Details about statistics can be found in [Supplementary Tables 1 and 2](#).

## Discussion

Changes in the rate of circulating leukocytes serve as simple, rapid and economical markers of inflammation in many diseases (28). Such markers will be highly desirable for the early detection of immune changes during space missions to allow early diagnosis and timely treatment. Indeed, increasing and activating neutrophils will induce inflammation and the release of enzymes and reactive oxygen species that damage cells and tissues (29). There is evidence that platelets contribute to the

inflammatory response (30), and lymphocyte counts may be affected by inflammation, infection and stress. In this context, NLR and PLR, which integrate two kinds of immune cells, are more reliable markers than the count of single immune cells.

## NLR and GLR are increased after head-down tilt bed rest

The only previous study assessing NLR and GLR as biomarkers to monitor immune status during space missions revealed that spaceflight significantly increased rodent NLR at the end of the 14-day Spacelab Life Sciences-2 mission and immediately postlanding (R+0). Then, rodent NLR decreased, suggesting a readaptation response to Earth’s gravity (20). This



study also showed that the GLR of 23 astronauts who participated in 6-month ISS expeditions was elevated after 180 days in orbit and in samples collected within 2 to 3 hours postlanding (R+0). Postflight GLR later recovered to preflight baseline levels, again suggesting readaptation. Thus, this study revealed progressive increases in NLR and GLR that were statistically significant at the end of the space mission and immediately postlanding in rodents and humans, suggesting that these ratios may be useful biomarkers to monitor astronaut immune status. A very similar pattern was observed during this long-term head-down tilt bed rest. However, no increase in NLR and GLR was observed at HDTBR60, and a lower GLR increase was noted (mean GLR of 3.6 in astronauts at R+0 (20) versus mean GLR of 2.6 in head-down tilt bed rest volunteers at R+1). These differences are likely due to the fact that our head-down tilt bed rest was of a limited duration, that we did not collect blood at R+0, thereby allowing readaptation during 24 hours, and the absence of radiation which causes inflammation (31, 32). However, our results, which are deduced from 20 volunteers, are consistent with astronauts' data, thereby confirming that NLR and GLR could potentially be useful markers to monitor the immune system during space missions. It is also very interesting to note that these slight increases in NLR and GLR are associated with major acute physical stress, landing in the case of spaceflight and the switch from 60 days of prone position to an upright position in the case of head-down tilt bed rest. These stresses certainly contribute to NLR and GLR peaks, as it is known that stress can lead to neutrophil demargination, and increases in NLR were observed up to 3 hours after intense training, with the extent of the increase depending on the training protocol (33). Thus, an increase in NLR or GLR seems to be a biomarker of acute physical stress, which can induce inflammation (34). In the future, it would be very interesting to study these markers before and after extravehicular activities, for example, to confirm their diagnostic interest.

## PLR increases after two months of head-down tilt bed rest

With regard to PLR, which has not been previously studied during space missions or head-down tilt bed rest exposure, we noted that this biomarker increased slightly and gradually after head-down tilt bed rest. This progressive increase could be due to a change in hematopoiesis. Indeed, Liu et al. (22) observed an enhancement of erythropoiesis during recovery in these volunteers, which was confirmed by Bonnefoy et al. (11). In addition, these authors noted an increase of platelets after HDTBR which they attributed to a slight increase in thrombopoiesis.

Interestingly, it has been reported that an increase in PLR correlates with disease activity of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Fu et al. (12) and Wu et al. (14) determined mean PLR values of 125 (min 67; max 212) and 99 (min 85; max 119) in healthy volunteers

and of 179 (min 46; max 417) and 138 (min 94; max 223) in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients, respectively. Our mean PLR value at BDC-4 (120; min 71; max 189) is similar to that determined for healthy volunteers. Our mean PLR value at R+60 (149; min 93; max 284) is below the value of 179 for rheumatoid arthritis but close to the value of 138 determined for systemic lupus erythematosus.

Even if to date there is no clear evidence that spaceflight is associated with a risk of developing autoimmune disease, this possibility is an interesting avenue for further research as it is not quite comparable to the specific inflammation triggers observed in previous astronaut/cosmonaut subjects. Indeed, it was shown that murine medullary thymic epithelial cells (mTECs) are reduced after 14 days of hindlimb unloading (35), a model classically used to mimic the effects of spaceflight (36). Given that mTECs expressing tissue-specific antigens are critical for removing self-reactive T-cells and generating regulatory T-cells (37), this model may increase the risk of autoimmune disease. It was also shown that socioenvironmental stressors such as those encountered during space missions partially affect the murine TCR $\beta$  repertoire and could increase the self-reactivity of this repertoire (38). Postflight cytokine data collected from crew members revealed a decrease in TH1 cytokine expression (39), suggesting a potential TH2 cytokine shift that represents a significant clinical risk for TH2-related autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Finally, our previous data revealed that two out of five analyzed cosmonauts presented significant changes in their IgM repertoire that persisted up to 30 days after landing (40). Thus, investigating PLR during space missions might be of interest because more prolonged-development diseases could occur (4).

## Limitations

This study is limited by the duration of head-down tilt bed rest exposure, interindividual differences which likely explain large variability in the data, and the fact that head-down tilt bed rest does not include a combination of some major spaceflight-encountered stressors such as radiation, disrupted circadian rhythm, high performance expectations, and the risk of equipment failure or fatal accidents. However, we are confident in our results because the subjects were under highly controlled study conditions and, as shown above, our data are consistent with previously collected space data.

## Conclusion and perspectives

In summary, this report highlights that simple, cost-effective, low-risk tests, such as determining neutrophil to lymphocyte (NLR) and platelet to lymphocyte (PLR) ratios, could aid in monitoring immune health during space missions. Our results are consistent with a previous study conducted on 23 astronauts who spent 6



months on the ISS (20), but further studies on larger cohorts will be needed to define space-appropriate NLR and PLR thresholds that can be used to predict risk. We recommend coupling these ratios to other biomarkers, such as cytokine quantification as increases in proinflammatory cytokines have been repeatedly observed in astronauts/cosmonauts (5–7), and viral load measurements as latent virus reactivation has also been frequently reported in these subjects and is a good biomarker of spaceflight-induced weakening of cell-mediated immunity (41). Such combination of biomarkers could allow to efficiently detect immune dysfunction, determine when countermeasures should be applied to promote immune recovery, prevent the development of disease, and track responses to treatment during space missions. Given recent progress in space biotechnology regarding the monitoring of peripheral white blood cells and differential cell counts (neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils) within minutes from a fingerstick blood sample (42), the development of a Varicella zoster virus detection kit that can be used in space (43, 44), and the possibility of quantifying cytokines and stress markers using luminescence- or fluorescence-based assays (45), it can be hoped that such analyses will be implemented in the near future on the ISS and then on spacecrafts involved in future deep-space missions. These advances will also be of paramount importance to defeat diseases on Earth at the patient bed site, especially in medical deserts, and will contribute to telemedicine improvement.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Author contributions

PJ, JB and SG analyzed the data and performed statistical analyses. PJ and J-PF wrote the manuscript. JB and SG revised the manuscript. J-PF designed and supervised the project. J-PF obtained funding resources. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## References

1. Crucian BE, Choukèr A, Simpson RJ, Mehta S, Marshall G, Smith SM, et al. Immune system dysregulation during spaceflight: Potential countermeasures for deep space exploration missions. *Front Immunol* (2018) 9:1437. doi: 10.3389/fimmu.2018.01437
2. Akiyama T, Horie K, Hinoi E, Hiraiwa M, Kato A, Maekawa Y, et al. How does spaceflight affect the acquired immune system? *NPJ Microgravity* (2020) 6:14. doi: 10.1038/s41526-020-0104-1
3. Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, Bueb JL, Tschirhart E, Legrand-Frossi C, et al. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude

## Funding

This study was funded by the European Space Agency and the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES, the French Space Agency). Investigators' costs were covered by CNES (grants DAR 4800001108 and DAR 4800001163), the French Ministry of Higher Education and Research, the University of Lorraine, and the French State-Region Project Contract (CPER).

## Acknowledgments

We thank the staff of the Institute of Space Medicine and Physiology, Toulouse, France, for having organized and carried out this head-down tilt bed rest study, especially Dr. Marie-Pierre Bareille and Dr. Arnaud Beck. We also express our thanks to the volunteers for their participation and cooperation.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.952928/full#supplementary-material>

the expansion of human presence beyond earth's orbit? *J Leukoc Biol* (2009) 86:1027–38. doi: 10.1189/jlb.0309167

4. Crucian B, Babiak-Vazquez A, Johnston S, Pierson D, Ott CM, Sams C. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *Int J Gen Med* (2016) 9:383–91. doi: 10.2147/IJGM.S114188

5. Crucian BE, Zwart SR, Mehta S, Uchakin P, Quiariarte HD, Pierson D, et al. Plasma cytokine concentrations indicate that *In vivo* hormonal regulation of immunity is altered during long-duration spaceflight. *J Interferon Cytokine Res* (2014) 34:778–86. doi: 10.1089/jir.2013.0129



6. Buchheim JI, Matzel S, Rykova M, Vassilieva G, Ponomarev S, Nichiporuk I, et al. Stress related shift toward inflammaging in cosmonauts after long-duration space flight. *Front Physiol* (2019) 10:85. doi: 10.3389/fphys.2019.00085
7. Krieger SS, Zwart SR, Mehta S, Wu H, Simpson RJ, Smith SM, et al. Alterations in saliva and plasma cytokine concentrations during long-duration spaceflight. *Front Immunol* (2021) 12:725748. doi: 10.3389/fimmu.2021.725748
8. Batista MA, Calvo-Fortes F, Silveira-Nunes G, Camatta GC, Speziali E, Turroni S, et al. Inflammaging in endemic areas for infectious diseases. *Front Immunol* (2020) 11:579972. doi: 10.3389/fimmu.2020.579972
9. Perdaens O, van Pesch V. Molecular mechanisms of immunosenescence and inflammaging: Relevance to the immunopathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Front Neurol* (2022) 12:811518. doi: 10.3389/fneur.2021.811518
10. Pandiarajan M, Hargens AR. Ground-based analogs for human spaceflight. *Front Physiol* (2020) 11:716. doi: 10.3389/fphys.2020.00716
11. Bonneyfoy J, Baselet B, Moser D, Ghislin S, Miranda S, Riant E, et al. B-cell homeostasis is maintained during two months of head-down tilt bed rest with or without antioxidant supplementation. *Front Immunol* (2022) 13:830662. doi: 10.3389/fimmu.2022.830662
12. Fu H, Qin B, Hu Z, Ma N, Yang M, Wei T, et al. Neutrophil- and platelet-to-Lymphocyte ratios are correlated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Lab* (2015) 61:269–73. doi: 10.7754/clin.lab.2014.140927
13. Kawamura Y, Takeshita S, Kanai T, Yoshida Y, Nonoyama S. The combined usefulness of the neutrophil-to-Lymphocyte and platelet-to-Lymphocyte ratios in predicting intravenous immunoglobulin resistance with Kawasaki disease. *J Pediatr* (2016) 178:281–284.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.07.035
14. Wu Y, Chen Y, Yang X, Chen L, Yang Y. Neutrophil-to-Lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-Lymphocyte ratio (PLR) were associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol* (2016) 36:94–9. doi: 10.1016/j.intimp.2016.04.006
15. Demirdal T, Sen P. The significance of neutrophil-lymphocyte ratio, platelet-lymphocyte ratio and lymphocyte-monocyte ratio in predicting peripheral arterial disease, peripheral neuropathy, osteomyelitis and amputation in diabetic foot infection. *Diabetes Res Clin Pract* (2018) 144:118–25. doi: 10.1016/j.diabetes.2018.08.009
16. Serban D, Papanas N, Dascalu AM, Kempler P, Raz I, Rizvi AA, et al. Significance of neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and platelet lymphocyte ratio (PLR) in diabetic foot ulcer and potential new therapeutic targets. *Int J Low Extrem Wounds* (2021) 18. doi: 10.1177/153473462111057742
17. Isaac V, Wu CY, Huang CT, Baune BT, Tseng CL, McLachlan CS. Elevated neutrophil to lymphocyte ratio predicts mortality in medical inpatients with multiple chronic conditions. *Med (Baltimore)* (2016) 95:e3832. doi: 10.1097/MD.0000000000003832
18. Delp MD, Charvat JM, Limoli CL, Globus RK, Ghosh P. Apollo Lunar astronauts show higher cardiovascular disease mortality: Possible deep space radiation effects on the vascular endothelium. *Sci Rep* (2016) 6:29901. doi: 10.1038/srep29901
19. Cortese F, Klokov D, Osipov A, Stefaniak J, Moskalev A, Schastnaya J, et al. Vive la radioresistance!: converging research in radiobiology and biogerontology to enhance human radioresistance for deep space exploration and colonization. *Oncotarget* (2018) 9:14692–722. doi: 10.18632/oncotarget.24461
20. Paul AM, Mhatre SD, Cekanaviciute E, Schreurs AS, Tahimic CGT, Globus RK, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte ratio: A biomarker to monitor the immune status of astronauts. *Front Immunol* (2020) 11:564950. doi: 10.3389/fimmu.2020.564950
21. Austermann K, Baecker N, Zwart SR, Fimmers R, Frippiat JP, Stehle P, et al. Antioxidant supplementation does not affect bone turnover markers during 60 days of 6° head-down tilt bed rest: Results from an exploratory randomized controlled trial. *J Nutr* (2021) 151:1527–38. doi: 10.1093/jn/nxab036
22. Liu T, Melkus G, Ramsay T, Sheikh A, Laneuville O, Trudel G. Bone marrow reversion with reambulation: A prospective clinical trial. *Invest Radiol* (2021) 56:215–23. doi: 10.1097/RLI.0000000000000730
23. Culliton K, Louati H, Laneuville O, Ramsay T, Trudel G. Six degrees head-down tilt bed rest caused low-grade hemolysis: A prospective randomized clinical trial. *NPJ Microgravity* (2021) 7:4. doi: 10.1038/s41526-021-00132-0
24. Arc-Chagnaud C, Py G, Fovet T, Roumanille R, Demangel R, Pagano AF, et al. Evaluation of an antioxidant and anti-inflammatory cocktail against human hypoxia-induced skeletal muscle deconditioning. *Front Physiol* (2020) 11:71. doi: 10.3389/fphys.2020.00071
25. Brauns K, Friedl-Werner A, Gunga HC, Stahn AC. Effects of two months of bed rest and antioxidant supplementation on attentional processing. *Cortex* (2021) 141:81–93. doi: 10.1016/j.cortex.2021.03.026
26. Solbiati S, Landreani F, Turcato M, Martin-Yebra A, Costantini L, Vaida P, et al. Analysis of changes in cardiac circadian rhythms of RR and QT induced by a 60-day head-down bed rest with and without nutritional countermeasure. *Eur J Appl Physiol* (2020) 120:1699–710. doi: 10.1007/s00421-020-04404-7
27. Trim WV, Walhin JP, Koumanov F, Bouloumié A, Lindsay MA, Travers RL, et al. The impact of long-term physical inactivity on adipose tissue immunometabolism. *J Clin Endocrinol Metab* (2022) 107:177–91. doi: 10.1210/clinem/dgab647
28. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* (2010) 31:318–24. doi: 10.1016/j.it.2010.05.006
29. Nguyen GT, Green ER, Mecas J. Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front Cell Infect Microbiol* (2017) 7:373. doi: 10.3389/fcimb.2017.00373
30. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis *Via* collagen-dependent microparticle production. *Science* (2010) 327:580–3. doi: 10.1126/science.1181928
31. Parihar VK, Allen BD, Caressi C, Kwok S, Chu E, Tran KK, et al. Cosmic radiation exposure and persistent cognitive dysfunction. *Sci Rep* (2016) 6:34774. doi: 10.1038/srep34774
32. Barravecchia I, De Cesari C, Forcato M, Scebbia F, Pyankova OV, Bridger JM, et al. Microgravity and space radiation inhibit autophagy in human capillary endothelial cells, through either opposite or synergistic effects on specific molecular pathways. *Cell Mol Life Sci CMLS* (2021) 79:28. doi: 10.1007/s00018-021-04025-z
33. Wahl P, Mathes S, Bloch W, Zimmer P. Acute impact of recovery on the restoration of cellular immunological homeostasis. *Int J Sports Med* (2020) 41:12–20. doi: 10.1055/a-1015-0453
34. Santos de Lima K, Schuch FB, Camponogara Righi N, Chagas P, Hemann Lamberti M, Puntel GO, et al. Effects of the combination of vitamins c and e supplementation on oxidative stress, inflammation, muscle soreness, and muscle strength following acute physical exercise: Meta-analyses of randomized controlled trials. *Crit Rev Food Sci Nutr* (2022) 9:1–14. doi: 10.1080/10408398.2022.2048290
35. Horie K, Kudo T, Yoshinaga R, Akiyama N, Sasanuma H, Kobayashi TJ, et al. Long-term hindlimb unloading causes a preferential reduction of medullary thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator (Aire). *Biochem Biophys Res Commun* (2018) 501:745–50. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.060
36. Globus RK, Morey-Holton E. Hindlimb unloading: Rodent analog for microgravity. *J Appl Physiol* (2016) 120:1196–206. doi: 10.1152/jappphysiol.00997.2015
37. Abramson J, Anderson G. Thymic epithelial cells. *Annu Rev Immunol* (2017) 35:85–118. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052320
38. Fonte C, Kaminski S, Vanet A, Lanfumey L, Cohen-Salmon C, Ghislin S, et al. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR- $\beta$  repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB J* (2019) 33:896–908. doi: 10.1096/fj.201800969R
39. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med* (2008) 79:835–43. doi: 10.3357/ASEM.2276.2008
40. Buchheim J, Ghislin S, Ouzren N, Albuissou E, Vanet A, Matzel S, et al. Plasticity of the human IgM repertoire in response to long-term spaceflight. *FASEB J* (2020) 34:16144–62. doi: 10.1096/fj.202001403RR
41. Kunz HE, Makedonas G, Mehta SK, Tyring SK, Vangipuram R, Quiarte H, et al. Zoster patients on earth and astronauts in space share similar immunologic profiles. *Life Sci Space Res* (2020) 25:119–28. doi: 10.1016/j.lssr.2019.10.001
42. Crucian B, Valentine R, Calaway K, Miller R, Rubins K, Hopkins M, et al. Spaceflight validation of technology for point-of-care monitoring of peripheral blood WBC and differential in astronauts during space missions. *Life Sci Space Res* (2021) 31:29–33. doi: 10.1016/j.lssr.2021.07.003
43. Cohrs RL. Rapid saline test for varicella zoster virus. *Eur J Mol Clin Med* (2015) 2:65. doi: 10.1016/j.nhtm.2014.11.036
44. Mehta SK, Pierson DL, Ott CM. Early detection of immune changes prevents painful shingles in astronauts and in earth-bound patients. *NASA Tech Innov* (2010) 3:12–5. doi: 10.1055/a-1015-0453
45. Frippiat JP. Space exploration and travel, future technologies for inflight monitoring and diagnostic. In: Shapshak P, Balaji S, Kanguane P, Chiappelli F, Somboonwit C, Menezes LJ, Sinnott JT, editors. *Global virology III: Virology in the 21st century*. Cham, Switzerland: Springer (2019). p. 471–84. doi: 10.1007/978-3-030-29022-1\_16



**Supplementary Table 1.** F ratios, associated degrees of freedom and p-values, provided by GraphPad Prism, using a mixed-effect model because there were some missing values at R+60 (3 volunteers dropped out at this time point).

	<b>F ratio</b>	<b>Degrees of freedom</b>	<b>p-values</b>
<b>NLR</b>	<b>8.474</b>	<b>128</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>GLR</b>	<b>8.404</b>	<b>128</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>PLR</b>	<b>6.384</b>	<b>128</b>	<b>0.0005</b>



**Supplementary Table 2.** Effect sizes and power for each analysis.

NLR			Cohen's d (effect size)				
Test details	Mean Difference	SE of difference	Value	Interpretation	Power	p-Value	Significance
BDC-4 vs. HDTBR20	-0.2345	0.1381	-1.70	Very large	>99%	0.625	ns
BDC-4 vs. HDTBR49	0.1175	0.1256	0.94	Large	84%	0.9616	ns
BDC-4 vs. HDTBR60	0.0025	0.1096	0.02	Very small	3%	>0.9999	ns
<b>BDC-4 vs. R+1</b>	<b>-0.7545</b>	<b>0.177</b>	<b>-4.26</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>0.0064</b>	<b>**</b>
BDC-4 vs. R+13	0.04	0.1088	0.37	Small	21%	0.9997	ns
BDC-4 vs. R+60	-0.2155	0.2113	-1.02	Large	87%	0.9418	ns
HDTBR20 vs. HDTBR49	0.352	0.1134	3.10	Huge	>99%	0.0714	ns
HDTBR20 vs. HDTBR60	0.237	0.1205	1.97	Very large	>99%	0.4645	ns
<b>HDTBR20 vs. R+1</b>	<b>-0.52</b>	<b>0.1575</b>	<b>-3.30</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>0.0483</b>	<b>*</b>
HDTBR20 vs. R+13	0.2745	0.1165	2.36	Huge	>99%	0.2694	ns
HDTBR20 vs. R+60	0.01897	0.2159	0.09	Very small	4.50%	>0.9999	ns
HDTBR49 vs. HDTBR60	-0.115	0.05885	-1.95	Very large	>99%	0.4721	ns
<b>HDTBR49 vs. R+1</b>	<b>-0.872</b>	<b>0.1185</b>	<b>-7.36</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>****</b>
HDTBR49 vs. R+13	-0.0775	0.08013	-0.97	Large	86%	0.9552	ns
HDTBR49 vs. R+60	-0.333	0.1748	-1.91	Very large	>99%	0.5048	ns
<b>HDTBR60 vs. R+1</b>	<b>-0.757</b>	<b>0.1289</b>	<b>-5.87</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>0.0002</b>	<b>***</b>
HDTBR60 vs. R+13	0.0375	0.07981	0.47	Medium	32%	0.999	ns

GLR			Cohen's d (effect size)				
Test details	Mean Difference	SE of difference	Value	Interpretation	Power	p-Value	Significance
BDC-4 vs. HDTBR20	-0.2525	0.1421	-1.78	Very large	>99%	0.5776	ns
BDC-4 vs. HDTBR49	0.1015	0.1298	0.78	Large	70%	0.9841	ns
BDC-4 vs. HDTBR60	-0.012	0.1092	-0.11	Very small	5%	>0.9999	ns
<b>BDC-4 vs. R+1</b>	<b>-0.7715</b>	<b>0.1799</b>	<b>-4.29</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>0.006</b>	<b>**</b>
BDC-4 vs. R+13	0.015	0.1086	0.14	Very small	6%	>0.9999	ns
BDC-4 vs. R+60	-0.2411	0.2125	-1.13	Very large	93%	0.908	ns
HDTBR20 vs. HDTBR49	0.354	0.1144	3.09	Huge	>99%	0.0727	ns
HDTBR20 vs. HDTBR60	0.2405	0.1219	1.97	Very large	>99%	0.4616	ns
<b>HDTBR20 vs. R+1</b>	<b>-0.519</b>	<b>0.157</b>	<b>-3.31</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>0.048</b>	<b>*</b>
HDTBR20 vs. R+13	0.2675	0.1186	2.26	Huge	>99%	0.3141	ns
HDTBR20 vs. R+60	0.01144	0.2179	0.05	Very small	4.00%	>0.9999	ns
HDTBR49 vs. HDTBR60	-0.1135	0.06389	-1.78	Very large	>99%	0.5778	ns
<b>HDTBR49 vs. R+1</b>	<b>-0.873</b>	<b>0.1187</b>	<b>-7.35</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>****</b>
HDTBR49 vs. R+13	-0.0865	0.08214	-1.05	Large	91%	0.9342	ns



HDTBR49 vs. R+60	-0.3426	0.1754	-1.95	Very large	>99%	0.4773	ns
<b>HDTBR60 vs. R+1</b>	<b>-0.7595</b>	<b>0.1299</b>	<b>-5.85</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>0.0002</b>	<b>***</b>
HDTBR60 vs. R+13	0.027	0.07952	0.34	Small	19%	0.9998	ns

**PLR**

<i>Test details</i>	<i>Mean Difference</i>	<i>SE of difference</i>	<i>Cohen's d (effect size)</i>		<i>Power</i>	<i>p-Value</i>	<i>Significance</i>
			<i>Value</i>	<i>Interpretation</i>			
BDC-4 vs. HDTBR20	-5.006	4.724	-1.06	Large	92%	0.9323	ns
BDC-4 vs. HDTBR49	2.576	6.222	0.41	Medium	26%	0.9995	ns
BDC-4 vs. HDTBR60	-7.903	5.627	-1.40	Very large	>99%	0.793	ns
BDC-4 vs. R+1	-6.025	6.785	-0.89	Large	80%	0.9701	ns
<b>BDC-4 vs. R+13</b>	<b>-21.4</b>	<b>6.193</b>	<b>-3.46</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>0.0354</b>	<b>*</b>
BDC-4 vs. R+60	-29.49	9.906	-2.98	Huge	>99%	0.0996	ns
HDTBR20 vs. HDTBR49	7.583	5.298	1.43	Very large	>99%	0.779	ns
HDTBR20 vs. HDTBR60	-2.897	4.871	-0.59	Medium	47%	0.9962	ns
HDTBR20 vs. R+1	-1.019	5.122	-0.20	Small	9%	>0.9999	ns
<b>HDTBR20 vs. R+13</b>	<b>-16.39</b>	<b>4.523</b>	<b>-3.62</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>0.0249</b>	<b>*</b>
HDTBR20 vs. R+60	-24.48	8.378	-2.92	Huge	>99%	0.1098	ns
HDTBR49 vs. HDTBR60	-10.48	4.76	-2.20	Huge	>99%	0.3396	ns
HDTBR49 vs. R+1	-8.601	4.613	-1.86	Huge	>99%	0.5247	ns
<b>HDTBR49 vs. R+13</b>	<b>-23.98</b>	<b>5.637</b>	<b>-4.25</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>0.0065</b>	<b>**</b>
<b>HDTBR49 vs. R+60</b>	<b>-32.07</b>	<b>6.651</b>	<b>-4.82</b>	<b>Huge</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>0.0029</b>	<b>**</b>
HDTBR60 vs. R+1	1.878	4.909	0.38	Small	22%	0.9997	ns
HDTBR60 vs. R+13	-13.5	5.053	-2.67	Huge	>99%	0.1597	ns



#### **IV. Confirmation de l'intérêt des ratios NLR, GLR et PLR pour le monitoring du statut de santé des astronautes dans un modèle de microgravité simulée, la dry-immersion**

Un axe de recherche important dans le domaine spatial est l'identification de biomarqueurs faciles à mettre en œuvre, à interpréter, et peu onéreux afin de suivre la santé des astronautes et des voyageurs spatiaux dans le cadre du développement du tourisme spatial. A notre connaissance, les ratios NLR, GLR et PLR déjà utiles dans de nombreuses pathologies semblent être d'excellents candidats. Le ratio NLR a été évalué chez des astronautes, des rats ayant volés et des souris HU ce qui a montré son grand intérêt (Paul et al., 2020). Le PLR a été évalué dans le modèle HDTBR et semble prometteur (Jacob et al., 2022). L'un des biais de la recherche spatiale est qu'elle se concentre sur les hommes laissant place à peu de données concernant les femmes. Dans le but de confirmer la pertinence des biomarqueurs chez les hommes et les femmes, nous nous sommes intéressés à la DI, un modèle de microgravité simulée appliqué ici durant 5 jours à 19 hommes et 18 femmes. L'objectif de cette étude était de confirmer la pertinence de ces biomarqueurs tant chez les hommes que chez les femmes pour monitorer leur statut de santé, d'évaluer une potentielle différence liée au genre, et d'effectuer une première investigation concernant les causes des changements de ces biomarqueurs. Ainsi, nous avons confirmé l'intérêt des ratios NLR, GLR et PLR dans le modèle de DI chez les hommes et les femmes dont la cinétique était différente des variations était différence de celle du modèle HDTBR. Nous avons aussi pu mettre en évidence les possibles causes des changements observés différentes selon le sexe. En effet, l'augmentation de ces biomarqueurs sont positivement corrélés au stress et à l'inflammation chez les hommes et associé à des modification des facteurs cardiovasculaires chez les femmes.



#### **Article 4:**

ESA VIVALDI dry immersion microgravity simulations confirm the value of neutrophil/lymphocyte, granulocyte/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratios for monitoring astronaut health and show that increases in these ratios are associated with physical stress and some gender-specific factors

Pauline Jacob, Adrien Robin, Nastassia Navasiolava, Marc-Antoine Custaud, Marie-Pierre Bareille, Rebecca Billette De Villemeur, Inês Antunes, Angélique Van Ombergen, Guillemette Gauquelin-Koch and Jean-Pol Fripiat

Soumis à Immunity & Ageing le 4/10/2024



1 **ESA VIVALDI dry immersion microgravity simulations confirm the value of**  
2 **neutrophil/lymphocyte, granulocyte/lymphocyte and platelet/lymphocyte**  
3 **ratios for monitoring astronaut health and show that increases in these ratios**  
4 **are associated with physical stress and some gender-specific factors**

5  
6  
7 Pauline Jacob<sup>1</sup>, Adrien Robin<sup>2,3</sup>, Nastassia Navasiolava<sup>2</sup>, Marc-Antoine Custaud<sup>2</sup>, Marie-Pierre  
8 Bareille<sup>4</sup>, Rebecca Billette De Villemeur<sup>4</sup>, Inês Antunes<sup>5</sup>, Angelique Van Ombergen<sup>6</sup>,  
9 Guillemette Gauquelin-Koch<sup>7</sup> and Jean-Pol Frippiat<sup>1\*</sup>

10

11

12 <sup>1</sup> University of Lorraine, UR SIMPA, Stress Immunity Pathogens Laboratory, Faculty of  
13 Medicine, 9 avenue de la forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

14

15 <sup>2</sup> University of Angers, CRC, CHU Angers, Inserm, CNRS, MITOVASC, Equipe CARME,  
16 SFR ICAT, Angers, France.

17

18 <sup>3</sup> Department of Aerospace Engineering, Texas A&M University, College Station, TX, USA.

19

20 <sup>4</sup> Institute of Space Physiology and Medicine, MEDES, Toulouse, France.

21

22 <sup>5</sup> Telespazio Belgium S.R.L. for the European Space Agency, Noordwijk, The Netherlands.

23

24 <sup>6</sup> European Space Agency, Noordwijk, The Netherlands.

25

26 <sup>7</sup> Centre National d'Etudes Spatiales, Paris, France.

27

28

29

30

31 \*Correspondence: jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr



32 **ABSTRACT**

33

34 **Background** With future manned space projects involving missions of unprecedented duration,  
35 multisystem deconditioning induced by spaceflight could seriously affect the well-being and  
36 health of astronauts, especially as microgravity appears to accelerate age-related processes. Safe  
37 and easily determined in-flight biomarkers are therefore needed to monitor health status. In this  
38 study, we simulated space deconditioning with a 5-day dry immersion (DI) of 18 healthy  
39 women and 19 healthy men and evaluated the effects of this protocol on three biomarkers: the  
40 neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), the granulocyte-to-lymphocyte ratio (GLR) and the  
41 platelet-to-lymphocyte ratio (PLR).

42 **Results** Increases in all three ratios were observed in both men and women, as also observed at  
43 the end of a space mission or after a long-duration head-down tilt bed rest (HDBR). These  
44 increases were associated with physical stress in both sexes. Furthermore, we showed that these  
45 increases in NLR and GLR correlated with vascular-related factors in women and with stress  
46 and inflammation in men, suggesting that, in addition to physical stress, gender-specific factors  
47 could contribute to these increases. As for the increase in PLR, it did not predict the  
48 development of long-lasting immune diseases during DI, in contrast to two months of HDBR.

49 **Conclusion** These data show that the NLR, GLR and PLR ratios are potentially useful  
50 biomarkers that deserve further study to determine the relationships between their increase and  
51 microgravity-induced deconditioning and to clarify the mechanisms underlying their increase.

52

53

54 **KEYWORDS:** astronaut health, monitoring, deep-space missions, ground-based model,  
55 peripheral blood cells, biomarker, vascular, physical stress.

56

57

58



## 59 BACKGROUND

60

61 Manned spaceflight projects are increasing, as evidenced by the Gateway program, an  
62 international collaboration aimed at establishing humanity's first space station around the Moon  
63 and paving the way for the first human missions to Mars along with the development of space  
64 tourism, which is attracting a growing number of companies. However, during spaceflight, the  
65 body is subjected to a combination of socioenvironmental and physical stressors that induce  
66 numerous physiological deregulations, such as muscle atrophy, bone demineralization,  
67 cardiovascular and metabolic dysfunctions, altered cognitive processes and reduced  
68 immunological competence [1].

69 Implementing such ambitious programs therefore requires the preservation of astronauts' well-  
70 being and health. To this end, it is mandatory to identify safe, cost-effective, and easily  
71 determined in-flight biomarkers to monitor health status, determine when countermeasures  
72 should be applied to promote recovery, prevent the development of disease, and track responses  
73 to treatment during space missions.

74 Previous studies have suggested the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), the granulocyte-to-  
75 lymphocyte ratio (GLR), and the platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) as biomarkers for future  
76 in-flight immune health monitoring [2,3]. Changes in these ratios have also been associated  
77 with aging [4–6], which is interesting given that spaceflight may accelerate aging processes [7].

78 In this explorative study, we determined these three ratios in 19 men and 18 women subjected  
79 to 5 days of dry immersion (DI) during the European Space Agency (ESA) VIVALDI 1 and 2  
80 studies. DI involves whole-body thermoneutral immersion with a waterproof film separating  
81 the subject from the water, creating a supportless environment characterized by buoyancy-  
82 induced gravitational unloading, constant hydrostatic compression of superficial tissues with  
83 swift fluid centralization and headward fluid shift, constant ambient temperature, constant body  
84 position, and constant physical inactivity with an acute decrease in postural muscle load and  
85 body movements [8]. These factors are responsible for the multisystem deconditioning that  
86 occurs during this microgravity simulation.

87 The obtained results were compared with those observed during head-down tilt bed rest  
88 (HDBR), an Earth-based analog of spaceflight, and spaceflight. We also investigated whether  
89 these ratios are different in men and women because there are sex-related differences in  
90 hormones, stress, and immune responses as well as in cardiovascular, immunologic,



91 sensorimotor, musculoskeletal, reproductive and behavioral adaptations to spaceflight [9–11].  
92 Finally, we searched for correlations with markers of physical stress, soluble markers of  
93 endothelial status, as well as the atherogenic index of plasma (AIP), because AIP and elevated  
94 NLR and PLR are predictive of cardiovascular disease risk [12–14]. Correlations with urinary  
95 free cortisol (UFC) and high -sensitivity C -reactive protein (hsCRP) were also explored to  
96 investigate the contributions of stress and inflammation.

97 Increases in the NLR, GLR and PLR ratios were observed in both male and female volunteers  
98 subjected to DI, such as at the end of a space mission or longduration HDBR, which correlated  
99 with physical stress. Our studies also revealed the probable contribution of gender -specific  
100 factors to these increases. These data confirm the potential usefulness of the NLR, GLR and  
101 PLR ratios for monitoring astronaut health.

102

## 103 **RESULTS**

104

105 The DI protocol used in this study included 4 days of ambulatory baseline measurements before  
106 immersion (baseline data collection, BDC -4 to BDC -1), 5 days of DI (DI1 to DI5), and 2 full  
107 days of ambulatory recovery (R0, R+1).

108

### 109 **Dry immersion induces increases in NLR, GLR and PLR**

110 Figure 1 shows a progressive increase in the NLR, GLR and PLR ratios from BDC1 in women:  
111 + 47% ± 63% (mean ± s.e.m.) (p = 0.0003) for NLR, + 45% ± 65% (p = 0.0003) for GLR, and  
112 + 20% ± 13% (p = 0.0017) for PLR at DI3 compared with BDC -1. No statistically significant  
113 differences in the NLR, GLR or PLR values between BDC -4 and BDC -1 were noted, indicating  
114 that these ratios were stable before DI exposure. After DI3 -DI5, women NLR, GLR and PLR  
115 ratios decreased but did not reach, at R+1, the basal level observed at BDC and BDC -1, except  
116 for PLR. We also noted a progressive increase in the NLR, GLR and PLR ratios for men, but  
117 from BDC -4 onward. These three ratios were statistically greater at BDC -1 in men than at BDC  
118 4: + 35% ± 17% (mean ± s.e.m.) (p < 0.0001) for NLR, + 33% ± 14% (p < 0.0001) for GLR, and  
119 + 12% ± 14% (p = 0.0173) for PLR at BDC -1. After DI3, men NLR, GLR and PLR ratios  
120 decreased but did not return to the basal level observed at BDC -4. The very similar evolution  
121 of NLR and GLR in women and men occurred because basophil and eosinophil levels are lower  
122 in peripheral blood than are neutrophil levels, which represent 50–70% of the total leukocyte  
123 population. We also noted that the NLR and GLR ratios appeared to increase slightly more



124 during DI in men than in women. At DI -3, the mean male NLR and GLR values were  
125 approximately 25% greater than those for women ( $+ 25\% \pm 13\%$  and  $+ 25\% \pm 11\%$ ,  
126 respectively), but these differences were not statistically significant, indicating only a minor  
127 sex difference (Figure 2). Taken together, these data reveal a progressive increase in the NLR,  
128 GLR and PLR ratios during DI, with a somewhat more marked effect on the NLR and GLR in  
129 men, and then these ratios decrease after DI.

130

### 131 **Relationships between NLR, GLR, PLR and DI-associated biomechanical stress**

132 Jacob et al. (2022) previously suggested that increases in the NLR and GLR ratios could be  
133 biomarkers of physical stress. Thus, we assessed DI-induced biomechanical stress by studying  
134 the effects of this protocol on night sleep quality, back pain and general discomfort. Figure 3  
135 reveals a statistically significant decrease in the night sleep quality score, which coincided with  
136 increases in back pain and general discomfort during DI in both women and men. Then, we  
137 searched for correlations between the evolution of the NLR, GLR and PLR ratios and those of  
138 these three markers of DI-induced biomechanical stress. Out of the 18 possible relationships (9  
139 for women and 9 for men), 15 were statistically significant (Figures 4 and 5). Eleven positive  
140 correlations with back pain and general discomfort mean scores and four negative correlations  
141 with night sleep quality scores were observed. These observations support the existence of a  
142 link between physical stress and changes in NLR, GLR and PLR.

143

### 144 **Relationships between NLR, GLR, PLR, soluble markers of endothelial status, UFC and** 145 **hsCRP during dry immersion**

146 Given that Robin et al [8] reported a probable alteration in the endothelial survival/apoptosis  
147 balance in women involved in this 5-day DI protocol, that 7 days of DI have been shown to  
148 disturb endothelial functions in men [15], that stress can lead to neutrophil demargination and  
149 that an increase in neutrophils is a marker of inflammation, we searched for correlations  
150 between the evolution of NLR, GLR, PLR, and soluble markers of endothelial status (VEGF,  
151 VEGF-receptor 1, E-selectin), UFC and hsCRP levels during DI. Furthermore, as  
152 environmental hazards in space have an impact on the cardiovascular system [16], that higher  
153 cardiovascular disease mortality was observed in Apollo lunar astronaut[17], and that elevated  
154 NLR and PLR are predictive of cardiovascular disease risk on Earth[12,13], as the atherogenic  
155 index of plasma (AIP) [14], we also wondered whether there are correlations between changes  
156 in NLR, GLR and PLR and those in AIP. Statistically significant positive relationships were



157 observed between the evolution of NLR, GLR and VEGF -receptor 1 levels and between the  
158 evolution of NLR, GLR and AIP in women (Figure 6). In men, statistically significant positive  
159 correlations were observed between NLR, GLR, PLR and hsCRP levels ; between NLR, GLR  
160 and urinary free cortisol levels; and between PLR and VEGF levels (Figure 7). Taken together,  
161 these data suggest a link between endothelial status, alterations in the cardiovascular system,  
162 NLR and GLR in women, whereas in men, the evolution of these two ratios seems to be linked  
163 to inflammation and the stress response. Changes in PLR in men could also be associated with  
164 inflammation and VEGF levels.

165

## 166 **DISCUSSION**

167

168 Integrating two kinds of circulating immune cells by measuring ratios such as GLR, NLR and  
169 PLR, are more reliable biomarkers than the count of single immune cells and are predictive  
170 biomarkers for several inflammatory, autoimmune, infectious and cardiovascular diseases ;  
171 various types of cancer, and aging [4–6,13,18–22]. Furthermore, the use of ratios avoids having  
172 to consider DI-induced hemodynamic alterations.

173

### 174 **Real and simulated microgravity increases NLR and GLR**

175 Previous studies revealed statistically significant increases in the NLR and GLR ratios at the  
176 end of a space mission and immediately after landing in 23 astronauts (18 males and 5 females,  
177 data for both sexes mixed) and 5–15 male rats from the Space Life Sciences (SLS)-2 mission,  
178 followed by readaptation (recovery to preflight baseline levels) [2]. A very similar pattern was  
179 observed in 20 men one day after the completion of a 2-month HDBR [3]. However, the GLR  
180 increase was lower: the mean GLR was 3.6 at landing in astronauts returning from a 6-month  
181 mission on the ISS [2], whereas the mean GLR was 2.6 one day after HDBR in male volunteers  
182 [3]. The present study revealed the same increase in GLR in the 19 male volunteers after 3 days  
183 of DI (mean GLR of 2.6) and a smaller increase, but not significantly different from that  
184 observed in men, in the 18 female volunteers (mean GLR of 2.1) at that time point. An elevated  
185 NLR ratio was also noted in seven female mice after 14 days of hindlimb unloading [2], a  
186 physiological model of microgravity that can be considered the rodent equivalent of HDBR  
187 [23]. Interestingly, this increase in murine NLR was the same as that observed at landing in  
188 male rats from the SLS -2 mission. Taken together, these data indicate that increases in NLR



189 and GLR are recurrently observed in different species exposed to simulated or real microgravity  
190 and that sex does not significantly affect these ratios.

191

### 192 **DI-induced PLR increase does not presage the development of long -lasting immune** 193 **diseases, unlike two months of HDBR**

194 We previously noted that PLR increases gradually after two months of HDBR [3] to reach a  
195 value close to the value of 138 determined in systemic lupus erythematosus patients [21],  
196 suggesting the potential development of long -lasting immune diseases after exposure to this  
197 ground-based model of microgravity. Unfortunately, to our knowledge, this ratio has never been  
198 studied during space missions. However, a recent study reported that the platelet concentration  
199 is elevated during the first 2 weeks of flight, remains significantly elevated between months 2  
200 and 4 of the mission, and returns to the preflight value before the return from a 6-month mission  
201 [24]. These data suggest that the PLR ratio may increase during the first two-thirds of a long-  
202 duration flight. Even if it is currently unknown whether spaceflight increases the PLR ratio,  
203 which has been shown to be correlated with autoimmune disease activity [25], and there is no  
204 clear evidence that spaceflight is associated with a risk of developing such diseases, a few  
205 observations suggest that this could be the case, such as *i*) the decrease in murine medullary  
206 thymic epithelial cells observed after 14 days of hindlimb unloading [26], which are essential  
207 for the elimination of autoreactive T lymphocytes and the production of regulatory T  
208 lymphocytes [27]; *ii*) the fact that socioenvironmental stressors similar to those encountered  
209 during space missions could increase the autoreactivity of the murine TCR $\beta$  repertoire [28];  
210 and *iii*) the postflight decrease in TH1 cytokines in crew members suggesting a TH2 cytokine  
211 shift that represents a significant clinical risk for TH2-related autoimmune diseases [29]. Here,  
212 we noted that after three days of DI, PLR reached a peak of 137 in women and 129 in men, both  
213 values being close to those determined for patients with systemic lupus erythematosus.

214 However, thereafter, this ratio decreased in both men and women, indicating that the potential  
215 risk of long -lasting disease is low. This difference could be explained by the fact that DI -  
216 induced supportlessness and gravitational unloading due to buoyancy are key differences from  
217 HDBR and that DI is considered a faster model for simulating the effects of microgravity [30].

218

### 219 **Increases in NLR, GLR and PLR are associated with physical stress but not with major** 220 **inflammation during DI**

221 We previously suggested that an increase in NLR and GLR could be a biomarker of physical  
222 stress [3], such as landing or the switch from a prone to an upright position at the end of HDBR



223 because increases in NLR were observed up to 3 hours after intense training, with the extent of  
224 the increase depending on the training protocol [31]. The observation of statistically significant  
225 relationships between the evolution of the NLR, GLR, and PLR ratios and those of sleep quality,  
226 back pain and general discomfort used to evaluate DI-induced biomechanical stress confirmed  
227 the existence of a link between physical stress and changes in these ratios. However, in this  
228 study, we observed progressive increases in NLR, GLR and PLR during, and not at the end or  
229 just after DI exposure. This difference in kinetics could very well be because *i)* as indicated  
230 above, DI is considered a more rapid model for simulating the effects of microgravity, and *ii)*  
231 although DI and HDBR are two models that simulate microgravity, these models elicit different  
232 biomechanical responses. For example, the cervical region is differently affected by HDBR and  
233 DI; furthermore, visceral pain is associated with DI but not HDBR [32]. These biomechanical  
234 responses result in more back pain and discomfort during DI [8] than during HDBR [33]. We  
235 also noted that the NLR and GLR ratios in male volunteers are statistically greater at BDC-1  
236 than at BDC-4, which is not the case in female volunteers, as if men, but not women, were more  
237 apprehensive about DI exposure. Gender differences in brain structures and/or cognitive  
238 processes may be responsible for this sexually dimorphic response. Indeed, male rats are  
239 significantly more vulnerable to adult restraint stress (stress encountered during DI), at least in  
240 terms of measured emotional behaviors, whereas females are far more resilient [34]. This  
241 suggests a psychological contribution to the increases in NLR and GLR prior to DI exposure.  
242 This hypothesis is supported by the observation of positive correlations between these two  
243 ratios and UFC in men but not in women, as well as by the analyses of UFC levels which were  
244 increased in men but not in women, even though the kinetics were different (Figure 8).

245 As indicated above, increases in NLR and GLR are used as predictive biomarkers for several  
246 diseases. An elevated NLR ( $>3.53$ ) [35] has been implicated in clinical settings to identify  
247 heightened inflammation [19]. Neither HDBR nor DI induced such an NLR increase. An NLR  
248 value of 3.6 was observed only on the landing day after a 6-month mission on the ISS [2]. Thus,  
249 similar to the transient increase in PLR discussed above, the transient increases in NLR and  
250 GLR do not reflect major inflammation, although it remains to be determined whether landing  
251 on the Moon or Mars, where gravity is lower than that on Earth, will also lead to temporary  
252 increases. In agreement with this conclusion, cytokine quantification during the 2-month  
253 HDBR, which revealed an increase in NLR and GLR at R+1, revealed no evidence of  
254 inflammation, it even suggested a potentially lower systemic inflammatory status supported by  
255 an increase in serum cortisone [36], several independent studies revealed only low-grade



256 systemic inflammation in astronauts participating in long -duration ISS missions [37–39], and  
257 serum levels of hsCRP, which reflect acute inflammation, were stable in female participants  
258 and within normal ranges in male participants even if significant increases were noted at DI3  
259 and DI5 ( Figure 8 ). However, we cannot exclude possible low -grade systemic inflammation  
260 during DI, such as that associated with aging, because increases in NLR, GLR and PLR could  
261 be correlated with hsCRP levels in male subjects, such as in astronauts who also experience  
262 increased levels of C-reactive protein [40] and who are, thus far, predominantly male.

263

### 264 **NLR, GLR and vascular markers**

265 Spaceflight most likely damages the endothelium. Indeed, an increase in the plasma levels of  
266 von Willebrand factor, which is mainly secreted by the endothelium, was observed after  
267 spaceflight in 15 male cosmonauts who had completed orbital flights lasting from 115 to 205  
268 days [40]. Increases in the number of circulating endothelial cells, an index of endothelial  
269 damage, were noted after 2 months of HDBR [41]. Seven days of DI were shown to affect  
270 endothelial function in men [15], and women involved in these VIVALDI studies presented  
271 probable endothelial alterations [8]. Given the interplay between endothelial and immune cells,  
272 we searched for correlations among the NLR, GLR and vascular markers. We observed positive  
273 relationships between the evolution of NLR and GLR, and the ones of VEGFR -1 and AIP in  
274 women during DI. These findings suggest that the increases in women NLR and GLR could be  
275 due to a demargination of neutrophils linked to a modification of the endothelium. The absence  
276 of such a correlation in men could be due to sex-specific effects of chronic stressors on  
277 cardiovascular function [42]. Indeed, previous studies have reported that restraint stress and  
278 chronic stressors decrease estradiol levels and their effects [43–46], thus decreasing the  
279 cardiovascular protective effects of estrogens. Furthermore, a sharp decrease in the plasma  
280 progesterone concentration was reported after 5 days of DI compared with ambulatory  
281 conditions on the same day of the cycle in healthy women [47]. DI duration, which is probably  
282 too short in this study, is another possibility, as Navasiolava et al [15] reported changes in male  
283 endothelial functions in response to a 7-day DI. If future studies confirm that there are changes  
284 in endothelial function in men during longer DI, and that these changes can be associated with  
285 increases in the NLR and GLR, these ratios could be utilized as easy-to-determine biomarkers  
286 for monitoring the state of the vascular system during space missions. Given recent advances  
287 in space biotechnology for monitoring peripheral blood cells from scant blood samples[48,49],



288 we believe that these ratios could, in the near future, be monitored onboard spacecraft  
289 participating in future deep space missions.

290

## 291 **LIMITATIONS**

292 Our study is limited by the duration of DI exposure (5 days) and by the fact that we could not  
293 quantify hsCRP at BDC-4, DI1 and R+1; and UFC at BDC-4. However, research on the effects  
294 of 5 days of DI under the same conditions on both sexes and on a significant number of  
295 individuals is undeniably a unique feature of our study.

296

## 297 **CONCLUSION AND PERSPECTIVES**

298 This study revealed increases in the NLR, GLR and PLR ratios in both men and women  
299 subjected to 5 days of DI. Given that increases in NLR and GLR have been previously observed  
300 in both sexes of different species exposed to various models of reduced gravity or spaceflight,  
301 it appears that these increases, which are associated with physical stress, are consistently  
302 reproducible. Furthermore, we showed that increases in NLR and GLR correlated with  
303 vascular-related factors in women and with stress and inflammation in men, suggesting that, in  
304 addition to physical stress, sex-specific factors could contribute to these increases. Finally, this  
305 study revealed that the DI-induced increase in PLR does not predict the development of long -  
306 lasting immune diseases, unlike two months of HDBR. Further studies involving longer  
307 exposure to DI will be needed to confirm the predictive utility of the NLR, GLR and PLR ratios  
308 to monitor the health of the immune and vascular systems and age -related processes induced  
309 by spaceflight [7,50,51].

310

## 311 **METHODS**

312

### 313 **Ethics**

314 The VIVALDI 1 and 2 exploratory clinical trials were carried out in accordance with the World  
315 Medical Association Helsinki Declaration of 1975 (revised in 2008) and were approved by the  
316 National Ethics Committee (CPP Ile de France II, ID RCB 2021 -A00705-36 for VIVALDI 1  
317 performed on women, CPP Ile de France VII, ID -RCB 2022 -A00881-42 for VIVALDI 2  
318 performed on men). These trials are registered at [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) as NCT05043974 for  
319 VIVALDI 1 and NCT05493176 for VIVALDI 2.

320 Each trial involved the recruitment of 20 young healthy participants. All were informed about  
321 the experimental procedures and provided written consent. One female participant left the



322 protocol on the first day of immersion due to a technical issue (a technical problem with the  
323 bath lifting platform, which could not be fixed quickly without emptying the bath, leading to  
324 the decision to stop the study for this participant), and another could not be included for  
325 regulatory reasons (this participant unexpectedly was still in the exclusion period following  
326 participation in a previous unrelated clinical trial). One male participant withdrew from the  
327 study on the third day of immersion due to severe back pain. These three subjects were excluded  
328 from the analysis [52].

329

### 330 **Dry immersion**

331 Eighteen women (mean  $\pm$  s.e.m. at baseline, age:  $29 \pm 1$ ; height:  $164.8 \pm 1.4$  cm; weight:  $59 \pm$   
332  $1.5$  kg) and nineteen men (age:  $28 \pm 1$ ; height:  $176.6 \pm 1$  cm; weight:  $72 \pm 1.5$  kg) were  
333 ultimately included in the VIVALDI 1 and 2 studies, respectively. These subjects were  
334 confirmed to be healthy by a comprehensive clinical assessment, including a detailed medical  
335 history and complete physical examination. All were nonsmokers and were not taking any drugs  
336 or medications. The VIVALDI 1 and 2 studies were conducted at the Space Clinic of the  
337 Institute of Space Medicine and Physiology (MEDES-IMPS) in Toulouse, France, between  
338 September 2021 and November 2022. These studies were sponsored by the European Space  
339 Agency in collaboration with the French National Space Agency (CNES).

340 The participants arrived in the evening of the fifth day before exposure to DI and left in the  
341 morning of the third day after DI exposure. The experimental protocol included 4 days of  
342 ambulatory baseline measurements before immersion (baseline data collection, BDC4 to BDC-  
343 1), 5 days of DI (DI1 to DI5), and 2 full days of ambulatory recovery (R0, R+1). This 5-day DI  
344 was designed to study the effects of the early phase of adaptation to microgravity. DI involves  
345 immersing volunteers in thermoneutral water covered with elastic waterproof fabric. The  
346 participants, surrounded by the fabric, were freely suspended. The water enveloped them from  
347 all sides, but they remained dry. The film was thin and sufficiently large so that the hydrostatic  
348 pressure was equally distributed across the surface of the body. For a relatively short duration,  
349 this model can faithfully reproduce most of the physiological effects of actual microgravity  
350 [8,30].

351 VIVALDI 1 and 2 participants were subjected to a strict DI protocol (they were not allowed to  
352 sit or stand up at all) to be close to what happens during a spaceflight. However, daily hygiene,  
353 weighing and some specific measurements (as several scientific protocols were carried out in  
354 parallel during VIVALDI 1 and 2) necessitated extraction from the bath with an integrated



355 lifting platform. During these brief out-of-bath periods, the participants maintained the 6° head-  
356 down position. The water temperature was continuously maintained in a thermoneutral  
357 environment (32–34 °C). The light -off period was set at 23: 00–07:00. On each experimental  
358 day, meals were identical for all participants.

359

### 360 **Blood sampling**

361 Venous blood samples were collected in the morning before breakfast four days and one day  
362 before DI exposure (BDC -4 and BDC -1), in the evening of the first day of DI (DI1), in the  
363 morning of the third and fifth days of DI (DI3 and DI5), and in the morning of recovery day 1,  
364 approximately 22 h after completing DI (R+1).

365

### 366 **Blood analyses**

367 Blood cell counts were determined using an Advia 2120 automated hematology analyzer  
368 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, Illinois, USA). The NLR, GLR and PLR ratios  
369 were calculated from the neutrophil, granulocyte, platelet and lymphocyte counts provided by  
370 these blood count measurements. Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF -  
371 receptor 1 (VEGF -R1), and E -selectin were quantified by ELISA using human VEGF,  
372 VEGFR1/Flt-1, and sE -Selectin/CD62E Quantikine ELISA kits (R&D Biosystems,  
373 Minneapolis, Minnesota, USA ). The concentrations of high -sensitivity C -reactive protein  
374 (hsCRP), triglycerides (TGs) and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol were determined  
375 via immunoturbidimetry, enzymatic techniques, and catalase elimination, respectively (Advia  
376 Chemistry XPT systems, Siemens). From TG and HDL cholesterol molar concentrations, the  
377 atherogenic index of plasma (AIP), a marker of lipoprotein particle size, was calculated as the  
378  $\log (TG/HDL)$ .

379

### 380 **Questionnaires**

381 General discomfort and back pain (morning and evening) and the quality of night sleeping  
382 (morning) were assessed daily from BDC-4 to R+1 using a 0 to 10 visual analog scale [8].

383

### 384 **Quantification of urinary free cortisol**

385 Twenty-four-hour urine collection started in the morning with the 2nd void and ended after the  
386 first void the following day. All samples were pooled into a storage container kept at +4 °C.  
387 For each 24 h pool, aliquots were prepared and frozen at -80 °C. Urinary free cortisol (UFC)



388 was quantified via liquid chromatography–tandem mass spectrometry (Applied  
389 Biosystems/MDS Sciex Api 3000 triple quad mass spectrometer).

390

### 391 **Statistics**

392 The effects of DI and test days on NLR, GLR, PLR, mean of general discomfort, mean of back  
393 pain, sleep quality, UFC and hsCRP of men and women were determined via repeated-measures  
394 one-way ANOVA with the Geisser–Greenhouse correction in combination with a *post hoc*  
395 Tukey’s multiple comparison test or, when data points were missing, with a Geisser–  
396 Greenhouse-corrected linear mixed effects model using the restricted maximum likelihood  
397 method in combination with *post hoc* Tukey’s multiple comparison test. The effects of sex on  
398 NLR, GLR and PLR data were determined via repeated-measures two-way ANOVA with the  
399 Geisser–Greenhouse correction in combination with *post hoc* Sidak’s multiple comparison test  
400 or, when data points were missing, with a Geisser–Greenhouse-corrected linear mixed effects  
401 model using the restricted maximum likelihood method in combination with *post hoc* Sidak’s  
402 multiple comparison test. Relationships between variables of interest were examined using the  
403 Pearson correlation coefficient for normally distributed data or the Spearman correlation  
404 coefficient for nonnormally distributed data (one-tailed p value). The data were analyzed via  
405 GraphPad Prism 10.2.3. An adjusted p value < 0.05 was considered statistically significant. The  
406 data are shown as the mean ± s.e.m.

407

### 408 **LIST OF ABBREVIATIONS**

409

410 AIP: Atherogenic index of plasma  
411 BDC: Baseline data collection  
412 DI: Dry immersion  
413 ESA: European Space Agency  
414 GLR: Granulocyte-to-lymphocyte ratio  
415 HDBR: Head-down tilt bed rest  
416 hsCRP: High-sensitivity C-reactive protein  
417 ISS: International Space Station  
418 NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio  
419 PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio  
420 SLS-2: Space Life Sciences (SLS)-2 mission  
421 TCRβ: Beta chain of the T-cell receptor



422 UFC: Urinary free cortisol  
423 VEGF: Vascular endothelial growth factor  
424 VEGFR-1: Vascular endothelial growth factor receptor-1  
425

## 426 **DECLARATIONS**

427  
428 **Ethics approval and consent to participate**  
429 The VIVALDI 1 and 2 exploratory clinical trials were carried out in accordance with the World  
430 Medical Association Helsinki Declaration of 1975 (revised in 2008) and were approved by the  
431 National Ethics Committee (CPP Ile de France II, ID RCB 2021 -A00705-36 for VIVALDI 1  
432 performed on women, CPP Ile de France VII, ID -RCB 2022 -A00881-42 for VIVALDI 2  
433 performed on men). These trials are registered at [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) as NCT05043974 for  
434 VIVALDI 1 and NCT05493176 for VIVALDI 2. All participants were informed about the  
435 experimental procedures and provided written consent.

436  
437 **Consent for publication**

438 Not applicable.

439  
440 **Availability of data and materials**

441 All of the data generated or analyzed during this study are included in this published article and  
442 are available from the corresponding author upon reasonable request.

443  
444 **Competing interests**

445 The authors declare that they have no competing interests.

446  
447 **Funding**

448 The VIVALDI studies were funded by the European Space Agency (ESA). The Centre National  
449 d'Etudes Spatiales (CNES, the French Space Agency) was the promoter of these studies  
450 according to French law. P. Jacob received a Ph.D. grant from the French Ministry of Higher  
451 Education and Research. A. Robin received a Ph.D. grant from CNES and Région des Pays de  
452 la Loire and a postdoctoral grant supported by the Translational Research Institute through  
453 Cooperative Agreement NNX16AO69A. The investigators' costs were covered by CNES  
454 (DAR 4800001118 and DAR 4800001204), and the French Ministry of Higher Education and



455 Research. Funding bodies had no role in the design of this study ; the collection, analysis, and  
456 interpretation of data; or the writing of the manuscript.

457

#### 458 **Author contributions**

459 P.J., A.R. and N.N. collected and analyzed the data. N.N. and M.A.C. were leaders in the  
460 investigator team across the VIVALDI studies. M.P.B. and R.B.D.V. coordinated the study and  
461 experiments by the medical and paramedical teams at the MEDES clinic. I.A. and A.V.O.  
462 designed the VIVALDI studies. G.G.K. represented the promoter of the study. J.P.F conceived  
463 the data analyses. P.J. and J.P.F. were major contributors to the writing of the manuscript. All  
464 authors reviewed, edited, and approved the manuscript.

465

#### 466 **Acknowledgments**

467 We thank the participants who volunteered for these dry immersion investigations as well as  
468 the nurses, nutrition team, paramedical team, and medical team at the MEDES Space Clinic  
469 (Toulouse Rangueil Hospital).

470

#### 471 **REFERENCES**

472

473 1. Overbey EG, Kim J, Tierney BT, Park J, Houerbi N, Lucaci AG, et al. The Space Omics and  
474 Medical Atlas (SOMA) and international astronaut biobank. *Nature*. 2024;632:1145–54.

475 2. Paul AM, Mhatre SD, Cekanaviciute E, Schreurs A -S, Tahimic CGT, Globus RK, et al.  
476 Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio: A Biomarker to Monitor the Immune Status of Astronauts.  
477 *Front Immunol*. 2020;11:564950.

478 3. Jacob P, Bonnefoy J, Ghislin S, Fripiat J-P. Long-duration head-down tilt bed rest confirms  
479 the relevance of the neutrophil to lymphocyte ratio and suggests coupling it with the platelet to  
480 lymphocyte ratio to monitor the immune health of astronauts. *Front Immunol*. 2022;13:952928.

481 4. Atik YT, Cimen HI, Gul D, Arslan S, Kose O, Halis F. Are the preoperative  
482 neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte ratio predictive for lamina propria  
483 invasion in aging patients? *Aging Male*. 2020;23:1528–32.

484 5. Dillon K, Goodman ZT, Kaur SS, Levin B, McIntosh R. Neutrophil -to-Lymphocyte Ratio  
485 Amplifies the Effects of Aging on Decrements in Grip Strength and Its Functional Neural  
486 Underpinnings. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2023;78:882–9.

487 6. Pellegrino R, Paganelli R, Di Iorio A, Bandinelli S, Moretti A, Iolascon G, et al. Neutrophil,  
488 lymphocyte count, and neutrophil to lymphocyte ratio predict multimorbidity and mortality -  
489 results from the Baltimore Longitudinal Study on Aging follow -up study. *Geroscience*.  
490 2024;46:3047–59.



- 491 7. Strollo F, Vernikos J. Aging-like metabolic and adrenal changes in microgravity: State of the  
492 art in preparation for Mars. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021;126:236–42.
- 493 8. Robin A, Van Ombergen A, Laurens C, Bergouignan A, Vico L, Linossier M -T, et al.  
494 Comprehensive assessment of physiological responses in women during the ESA dry  
495 immersion VIVALDI microgravity simulation. *Nat Commun.* 2023;14:6311.
- 496 9. Mark S, Scott GBI, Donoviel DB, Leveton LB, Mahoney E, Charles JB, et al. The impact of  
497 sex and gender on adaptation to space: executive summary. *J Womens Health (Larchmt).*  
498 2014;23:941–7.
- 499 10. Evans JM, Knapp CF, Goswami N. Artificial Gravity as a Countermeasure to the  
500 Cardiovascular Deconditioning of Spaceflight: Gender Perspectives. *Front Physiol.*  
501 2018;9:716.
- 502 11. Wadhwa A, Moreno -Villanueva M, Crucian B, Wu H. Synergistic interplay between  
503 radiation and microgravity in spaceflight -related immunological health risks. *Immun Ageing.*  
504 2024;21:50.
- 505 12. Angkananard T, Anothaisintawee T, McEvoy M, Attia J, Thakkinstian A. Neutrophil  
506 Lymphocyte Ratio and Cardiovascular Disease Risk: A Systematic Review and MetaAnalysis.  
507 *Biomed Res Int.* 2018;2018:1–11.
- 508 13. Demirdal T, Sen P. The significance of neutrophil -lymphocyte ratio, platelet-lymphocyte  
509 ratio and lymphocyte -monocyte ratio in predicting peripheral arterial disease, peripheral  
510 neuropathy, osteomyelitis and amputation in diabetic foot infection. *Diabetes Res Clin Pract.*  
511 2018;144:118–25.
- 512 14. Rabiee Rad M, Ghasempour Dabaghi G, Darouei B, Amani -Beni R. The association of  
513 atherogenic index of plasma with cardiovascular outcomes in patients with coronary artery  
514 disease: A systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Diabetol.* 2024;23:119.
- 515 15. Navasiolava NM, Dignat -George F, Sabatier F, Larina IM, Demiot C, Fortrat J -O, et al.  
516 Enforced physical inactivity increases endothelial microparticle levels in healthy volunteers.  
517 *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299:H248-256.
- 518 16. Krittanawong C, Isath A, Kaplin S, Virk HUH, Fogg S, Wang Z, et al. Cardiovascular  
519 disease in space: A systematic review. *Prog Cardiovasc Dis.* 2023;81:33–41.
- 520 17. Delp MD, Charvat JM, Limoli CL, Globus RK, Ghosh P. Apollo Lunar Astronauts Show  
521 Higher Cardiovascular Disease Mortality: Possible Deep Space Radiation Effects on the  
522 Vascular Endothelium. *Sci Rep.* 2016;6:29901.
- 523 18. Fu H, Qin B, Hu Z, Ma N, Yang M, Wei T, et al. Neutrophil- and platelet-to-lymphocyte  
524 ratios are correlated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Lab.* 2015;61:269–73.
- 525 19. Isaac V, Wu C-Y, Huang C-T, Baune BT, Tseng C-L, McLachlan CS. Elevated neutrophil  
526 to lymphocyte ratio predicts mortality in medical inpatients with multiple chronic conditions.  
527 *Medicine.* 2016;95:e3832.



- 528 20. Kawamura Y, Takeshita S, Kanai T, Yoshida Y, Nonoyama S. The Combined Usefulness  
529 of the Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios in Predicting Intravenous  
530 Immunoglobulin Resistance with Kawasaki Disease. *J Pediatr.* 2016;178:281-284.e1.
- 531 21. Wu Y, Chen Y, Yang X, Chen L, Yang Y. Neutrophil -to-lymphocyte ratio (NLR) and  
532 platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) were associated with disease activity in patients with  
533 systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol.* 2016;36:94–9.
- 534 22. Serban D, Papanas N, Dascalu AM, Kempler P, Raz I, Rizvi AA, et al. Significance of  
535 Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) and Platelet Lymphocyte Ratio (PLR) in Diabetic Foot  
536 Ulcer and Potential New Therapeutic Targets. *Int J Low Extrem Wounds.*  
537 2021;15347346211057742.
- 538 23. Globus RK, Morey-Holton E. Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. *J Appl*  
539 *Physiol.* 2016;120:1196–206.
- 540 24. Kunz H, Quiariarte H, Simpson RJ, Ploutz -Snyder R, McMonigal K, Sams C, et al.  
541 Alterations in hematologic indices during long -duration spaceflight. *BMC Hematol.*  
542 2017;17:12.
- 543 25. Zinellu A, Mangoni AA. Neutrophil -to-lymphocyte and platelet -to-lymphocyte ratio and  
544 disease activity in rheumatoid arthritis: A systematic review and meta -analysis. *Eur J Clin*  
545 *Invest.* 2023;53:e13877.
- 546 26. Horie K, Kudo T, Yoshinaga R, Akiyama N, Sasanuma H, Kobayashi TJ, et al. Long-term  
547 hindlimb unloading causes a preferential reduction of medullary thymic epithelial cells  
548 expressing autoimmune regulator (Aire). *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;501:745–50.
- 549 27. Abramson J, Anderson G. Thymic Epithelial Cells. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:85–118.
- 550 28. Fonte C, Kaminski S, Vanet A, Lanfumey L, Cohen -Salmon C, Ghislin S, et al.  
551 Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR-  
552  $\beta$  repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB J.* 2019;33:896–908.
- 553 29. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. Immune System Dysregulation Following  
554 Short- vs Long-Duration Spaceflight. *Aviat Space Environ Med.* 2008;79:835–43.
- 555 30. Navasiolava NM, Custaud M -A, Tomilovskaya ES, Larina IM, Mano T, Gauquelin -Koch  
556 G, et al. Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur J Appl Physiol.* 2011;111:1235–  
557 60.
- 558 31. Wahl P, Mathes S, Bloch W, Zimmer P. Acute Impact of Recovery on the Restoration of  
559 Cellular Immunological Homeostasis. *Int J Sports Med.* 2020;41:12–20.
- 560 32. Treffel L, Massabuau N, Zuj K, Custaud M-A, Gauquelin-Koch G, Blanc S, et al. Pain and  
561 Vertebral Dysfunction in Dry Immersion: A Model of Microgravity Simulation Different from  
562 Bed Rest Studies. *Pain Res Manag.* 2017;2017:9602131.
- 563 33. Belavý DL, Armbrrecht G, Gast U, Richardson CA, Hides JA, Felsenberg D.  
564 Countermeasures against lumbar spine deconditioning in prolonged bed rest: resistive exercise  
565 with and without whole body vibration. *J Appl Physiol.* 2010;109:1801–11.



- 566 34. Zhang Y -D, Shi D -D, Zhang S, Wang Z. Sex -specific transcriptional signatures in the  
567 medial prefrontal cortex underlying sexually dimorphic behavioural responses to stress in rats.  
568 J Psychiatry Neurosci. 2023;48:E61–73.
- 569 35. Forget P, Khalifa C, Defour J-P, Latinne D, Van Pel M-C, De Kock M. What is the normal  
570 value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? BMC Res Notes. 2017;10:12.
- 571 36. Bonnefoy J, Baselet B, Moser D, Ghislin S, Miranda S, Riant E, et al. B-Cell Homeostasis  
572 Is Maintained During Two Months of Head-Down Tilt Bed Rest With or Without Antioxidant  
573 Supplementation. Front Immunol. 2022;13:830662.
- 574 37. Crucian BE, Zwart SR, Mehta S, Uchakin P, Quiariarte HD, Pierson D, et al. Plasma  
575 Cytokine Concentrations Indicate That *In Vivo* Hormonal Regulation of Immunity Is Altered  
576 During Long-Duration Spaceflight. J Interferon Cytokine Res. 2014;34:778–86.
- 577 38. Buchheim J-I, Matzel S, Rykova M, Vassilieva G, Ponomarev S, Nichiporuk I, et al. Stress  
578 Related Shift Toward Inflammaging in Cosmonauts After Long -Duration Space Flight. Front  
579 Physiol. 2019;10:85.
- 580 39. Krieger SS, Zwart SR, Mehta S, Wu H, Simpson RJ, Smith SM, et al. Alterations in Saliva  
581 and Plasma Cytokine Concentrations During Long -Duration Spaceflight. Front Immunol.  
582 2021;12:725748.
- 583 40. Kuzichkin DS, Nichiporuk IA, Zhuravleva OA, Markin AA, Rykova MP, Zhuravleva TV,  
584 et al. Endothelial dysfunction markers and immune response indices in cosmonauts' blood after  
585 long-duration space flights. npj Microgravity. 2022;8:46.
- 586 41. Demiot C, Dignat-George F, Fortrat J-O, Sabatier F, Gharib C, Larina I, et al. WISE 2005:  
587 chronic bed rest impairs microcirculatory endothelium in women. Am J Physiol Heart Circ  
588 Physiol. 2007;293:H3159-3164.
- 589 42. Vieira JO, Duarte JO, Costa -Ferreira W, Morais -Silva G, Marin MT, Crestani CC. Sex  
590 differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic  
591 stressors in rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2018;81:426–37.
- 592 43. Galea LA, McEwen BS, Tanapat P, Deak T, Spencer RL, Dhabhar FS. Sex differences in  
593 dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress.  
594 Neuroscience. 1997;81:689–97.
- 595 44. Solomon MB, Herman JP. Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and  
596 mental illness. Physiol Behav. 2009;97:250–8.
- 597 45. Walf AA, Frye CA. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological  
598 estradiol regimen may be modulated by hypothalamic -pituitary-adrenal axis activity.  
599 Neuropsychopharmacology. 2005;30:1288–301.
- 600 46. Lu J, Wu X-Y, Zhu Q-B, Li J, Shi L-G, Wu J-L, et al. Sex differences in the stress response  
601 in SD rats. Behav Brain Res. 2015;284:231–7.
- 602 47. Gorbacheva EY, Toniyan KA, Biriukova YA, Lukicheva NA, Orlov OI, Boyarintsev VV,  
603 et al. The State of the Organs of the Female Reproductive System after a 5 -Day “Dry”  
604 Immersion. Int J Mol Sci. 2023;24:4160.



- 605 48. Crucian B, Valentine R, Calaway K, Miller R, Rubins K, Hopkins M, et al. Spaceflight  
606 validation of technology for point-of-care monitoring of peripheral blood WBC and differential  
607 in astronauts during space missions. *Life Sci Space Res (Amt)*. 2021;31:29–33.
- 608 49. Rea DJ, Miller RS, Crucian BE, Valentine RW, Cristoforetti S, Bearg SB, et al. Single drop  
609 cytometry onboard the International Space Station. *Nat Commun*. 2024;15:2634.
- 610 50. Lescale C, Schenten V, Djeghloul D, Bennabi M, Gaignier F, Vandamme K, et al. Hind  
611 limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar  
612 to aging. *FASEB J*. 2015;29:455–63.
- 613 51. Fonte C, Jacob P, Vanet A, Ghislin S, Fripiat J -P. Hindlimb unloading, a physiological  
614 model of microgravity, modifies the murine bone marrow IgM repertoire in a similar manner  
615 as aging but less strongly. *Immun Ageing*. 2023;20:64.
- 616 52. Horeau M, Navasiolava N, Van Ombergen A, Custaud M-A, Robin A, Ropert M, et al. Dry  
617 immersion rapidly disturbs iron metabolism in men and women: results from the VIVALDI  
618 studies. *npj Microgravity*. 2024;10:68.

619

620

## 621 **FIGURE LEGENDS**

622

623 **Figure 1.** Evolution of the NLR (A), GLR (B) and PLR (C) ratios before, during and after five  
624 days of dry immersion in women (n=18) and men (n=19). The data are shown as mean ± s.e.m.  
625 Statistically significant differences were revealed via repeated-measures one-way ANOVA or  
626 linear mixed effects model analysis when data points were missing, both of which were  
627 followed by a Tukey *post hoc* test. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001. BDC,  
628 baseline data collection (pink); DI, dry immersion (blue); R, recovery (green).

629

630 **Figure 2.** Comparisons of the NLR (A), GLR (B) and PLR (C) ratios between women (n=18)  
631 and men (n=19) at each time point in the dry immersion studies. The dots and triangles indicate  
632 the means for women and men, respectively. The data are shown as mean ± s.e.m. No  
633 statistically significant differences between men and women for the NLR, GLR or PLR ratios  
634 were observed at any time point via repeated-measures two-way ANOVA or mixed effects  
635 model analysis when data points were missing, both of which were followed by a Sidak *post*  
636 *hoc* test. BDC, baseline data collection (pink); DI, dry immersion (blue); R, recovery (green).

637

638 **Figure 3.** Evolution of the night sleep quality score (A), back pain mean score (B) and general  
639 discomfort mean score (C) in women (n = 18) and men (n =19) exposed to five days of dry



640 immersion. The morning and evening back pain and discomfort scores were averaged to obtain  
641 a daily score. The data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. Statistically significant differences were  
642 revealed via repeated-measures one-way ANOVA or linear mixed effects model analysis when  
643 timepoints were missing, both of which were followed by Tukey's *post hoc* test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  
644  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . BDC, baseline data collection (pink); DI, dry immersion  
645 (blue); R, recovery (green).

646

647 **Figure 4.** Relationships between the night sleep quality score ( **A**), back pain mean score ( **B**),  
648 general discomfort mean score ( **C**), and NLR, GLR and PLR ratios in 18 women subjected to  
649 five days of DI. The morning and evening back pain and discomfort scores were averaged to  
650 obtain a daily score. Scatter plots for each relationship were generated via Pearson's correlation  
651 coefficient for normally distributed data or Spearman's correlation coefficient for nonnormally  
652 distributed data. BDC, baseline data collection (pink); DI, dry immersion (blue); R, recovery  
653 (green). Statistically significant correlations are framed in blue.

654

655 **Figure 5.** Relationships between the night sleep quality score ( **A**), back pain mean score ( **B**),  
656 general discomfort mean score ( **C**), and NLR, GLR and PLR ratios in 19 men subjected to five  
657 days of DI. The morning and evening back pain and discomfort scores were averaged to obtain  
658 a daily score. Scatter plots for each relationship were generated via Pearson's correlation  
659 coefficient for normally distributed data or Spearman's correlation coefficient for nonnormally  
660 distributed data. BDC, baseline data collection (pink); DI, dry immersion (blue); R, recovery  
661 (green). Statistically significant correlations are framed in blue.

662

663 **Figure 6.** Relationships between the NLR ( **A**), GLR ( **B**) and PLR ( **C**) ratios and stress, as  
664 assessed by urinary free cortisol (UFC) quantification; inflammation, as evaluated by high -  
665 sensitivity C-reactive protein (hsCRP) quantification; and the atherogenic indices of plasma  
666 (AIP) or endothelial markers (E-selectin, VEGFR-1, and VEGF) during dry immersion of 18  
667 women. Scatter plots for each relationship were generated via Pearson's correlation coefficient  
668 for normally distributed data or Spearman's correlation coefficient for nonnormally distributed  
669 data. BDC, baseline data collection (pink); DI, dry immersion (blue); R, recovery (green).  
670 Statistically significant correlations are framed in blue.

671

672 **Figure 7.** Relationships between the NLR ( **A**), GLR ( **B**) and PLR ( **C**) ratios and stress, as  
673 assessed by urinary free cortisol (UFC) quantification; inflammation, as evaluated by high -



674 sensitivity C-reactive protein (hsCRP) quantification ; and the atherogenic indices of plasma  
675 (AIP) or endothelial markers (E-selectin, VEGFR-1, and VEGF) during dry immersion of 19  
676 men. Scatter plots for each relationship were generated via Pearson's correlation coefficient for  
677 normally distributed data or Spearman's correlation coefficient for nonnormally distributed  
678 data. BDC, baseline data collection (pink); DI, dry immersion (blue); R, recovery (green).  
679 Statistically significant correlations are framed in blue.

680

681 **Figure 8.** Evolution of the concentrations of urinary free cortisol (UFC) **(A)** and high-sensitivity  
682 C-reactive protein (hsCRP) **(B)** in women (n = 18) and men (n =19) exposed to five days of dry  
683 immersion. Note that we could not quantify hsCRP at BDC-4, DI1, and R+1; or UFC at BDC-  
684 4. The data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. Statistically significant differences were revealed via  
685 repeated-measures one-way ANOVA or linear mixed effects model analysis when timepoints  
686 were missing, both of which were followed by Tukey's *post hoc* test. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\*  
687 p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001. BDC, baseline data collection (pink); DI, dry immersion (blue); R,  
688 recovery (green).

689



Figure 1

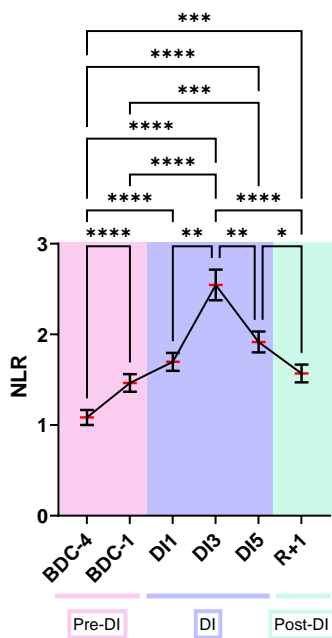
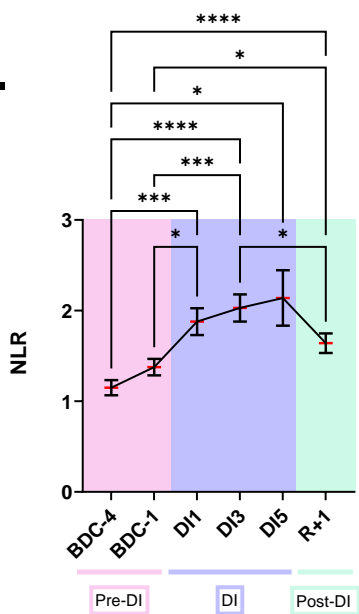
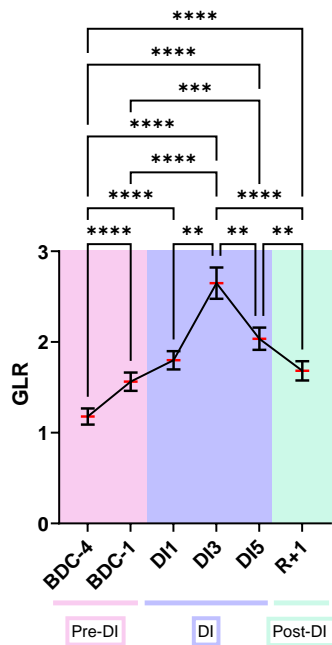
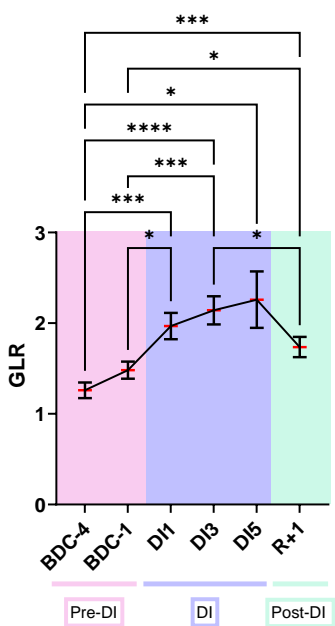
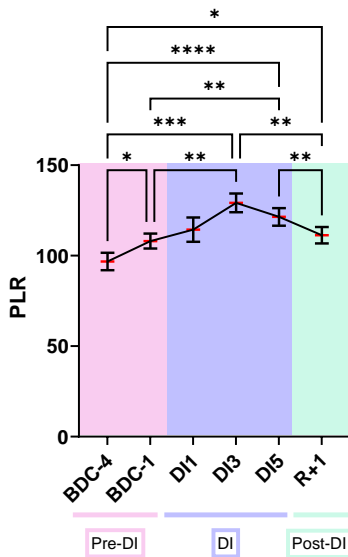
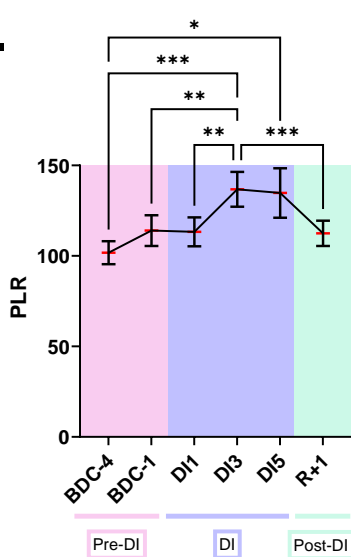
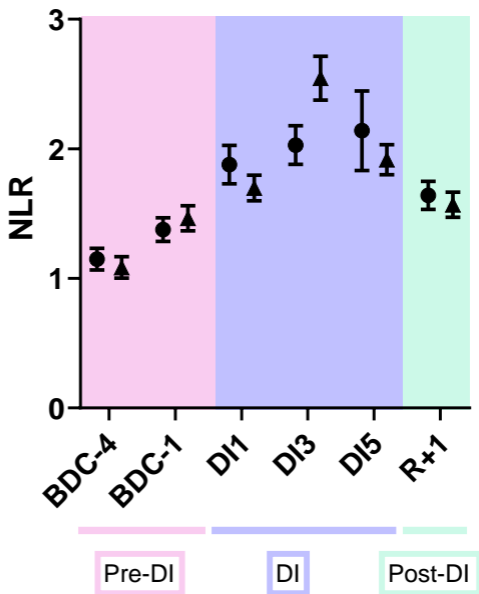
**Women****Men****A.****B.****C.**

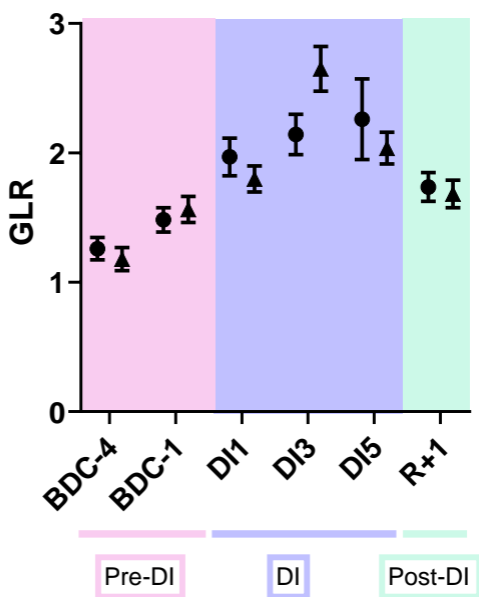


Figure 2

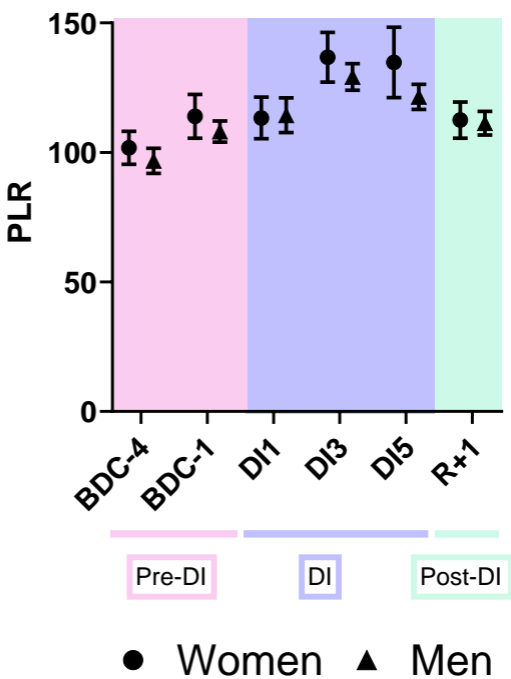
**A.**



**B.**



**C.**



● Women ▲ Men

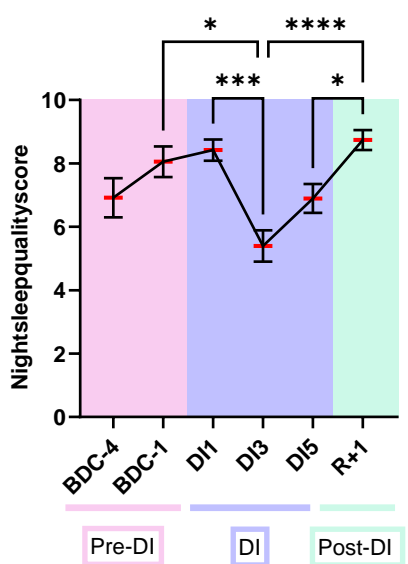
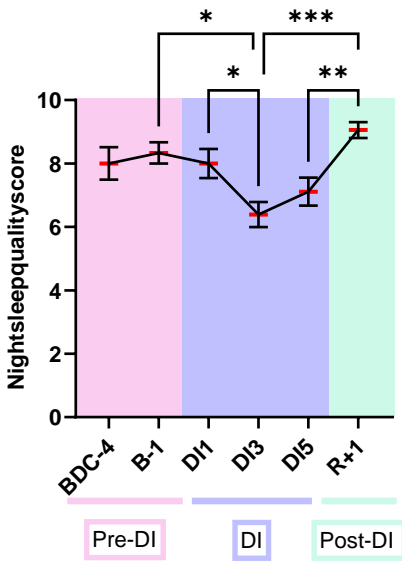


Figure 3

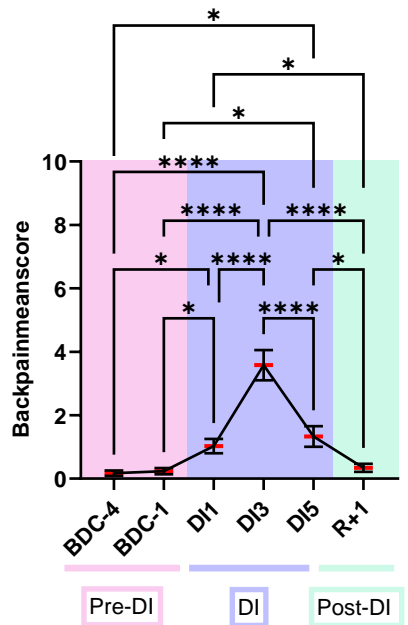
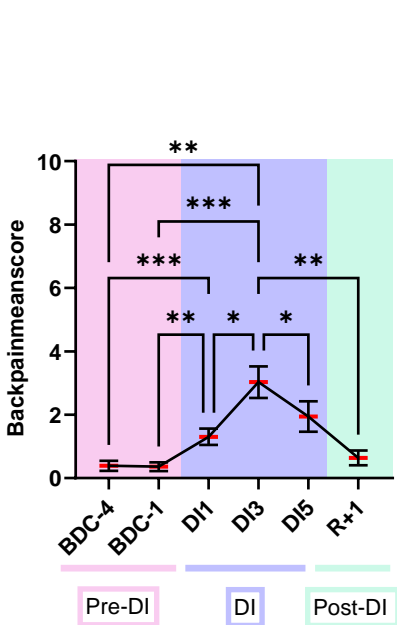
# Women

# Men

**A.**



**B.**



**C.**

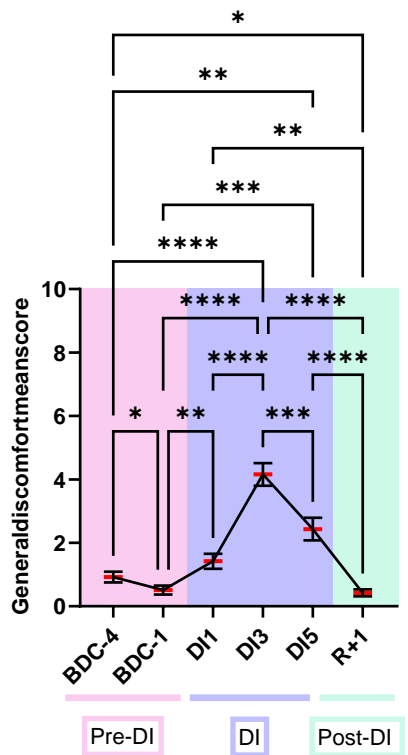
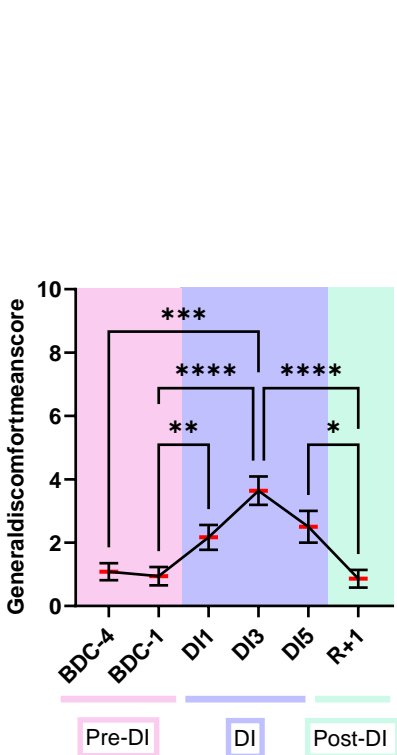
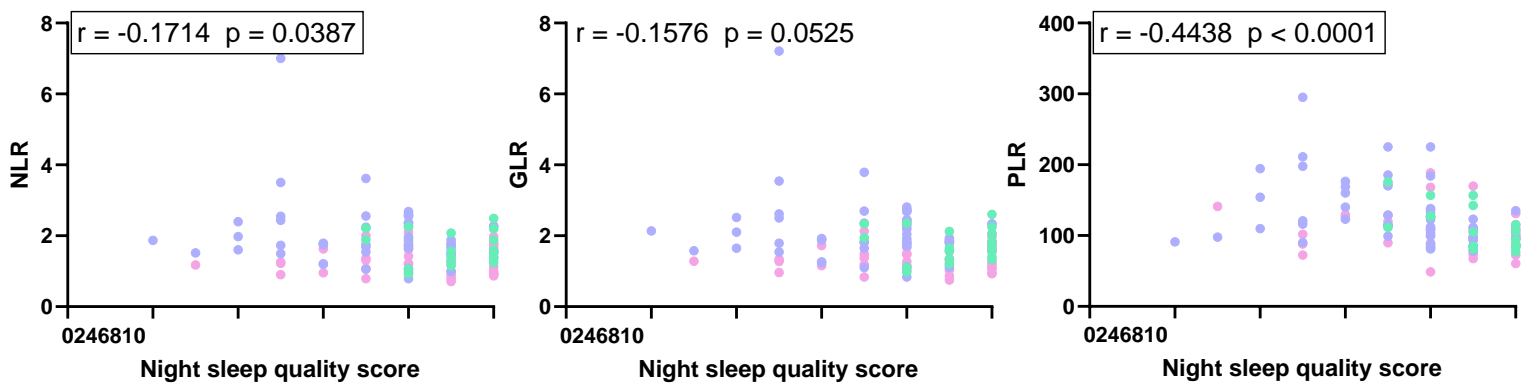




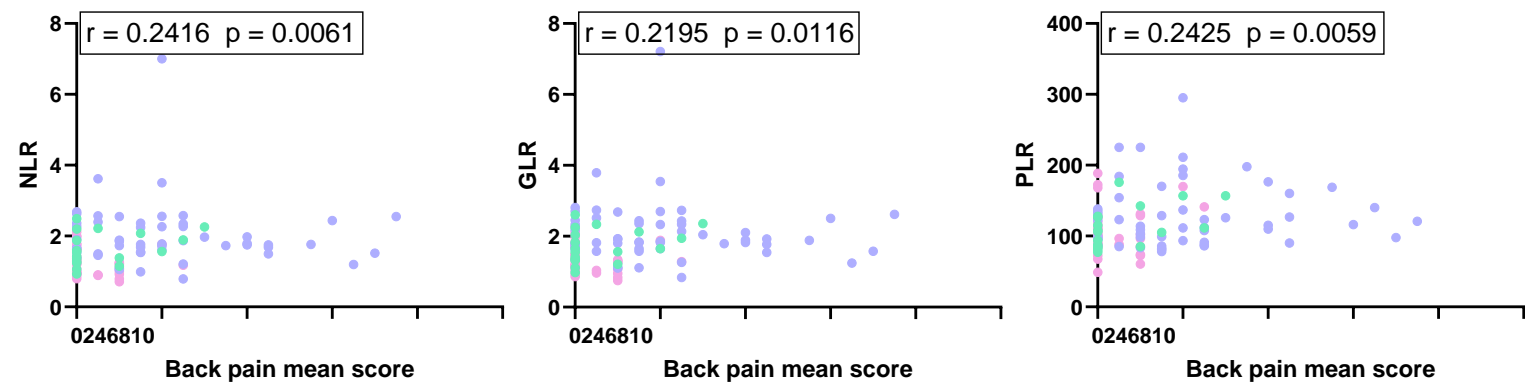
Figure 4 

# Women

**A.**



**B.**



**C.**

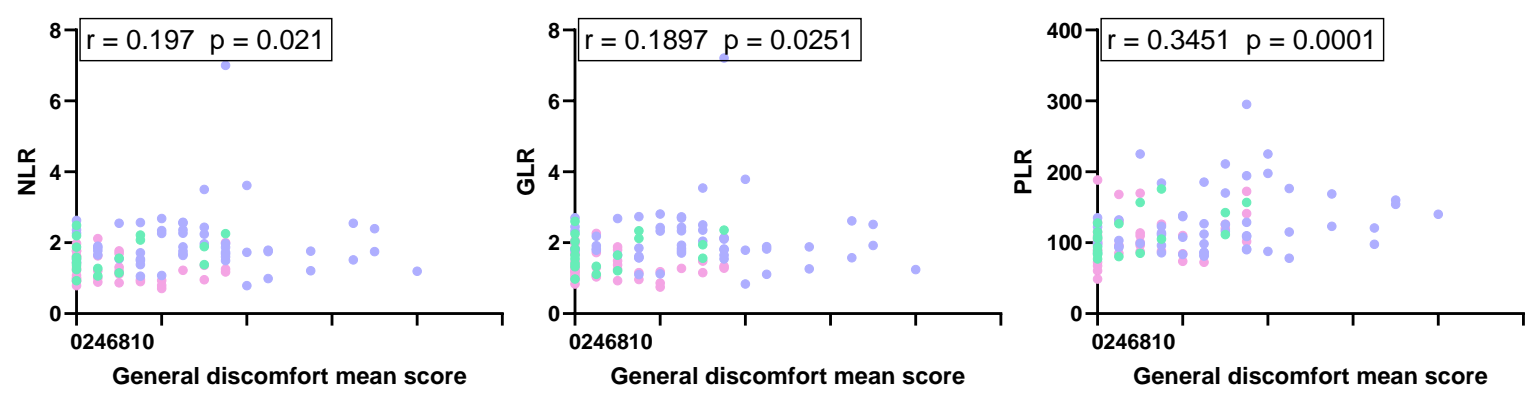
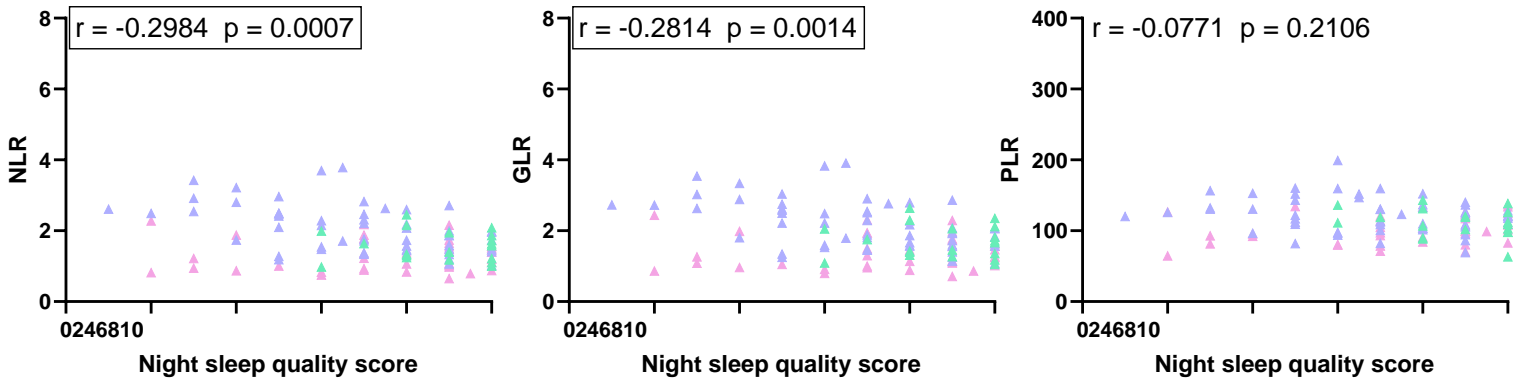




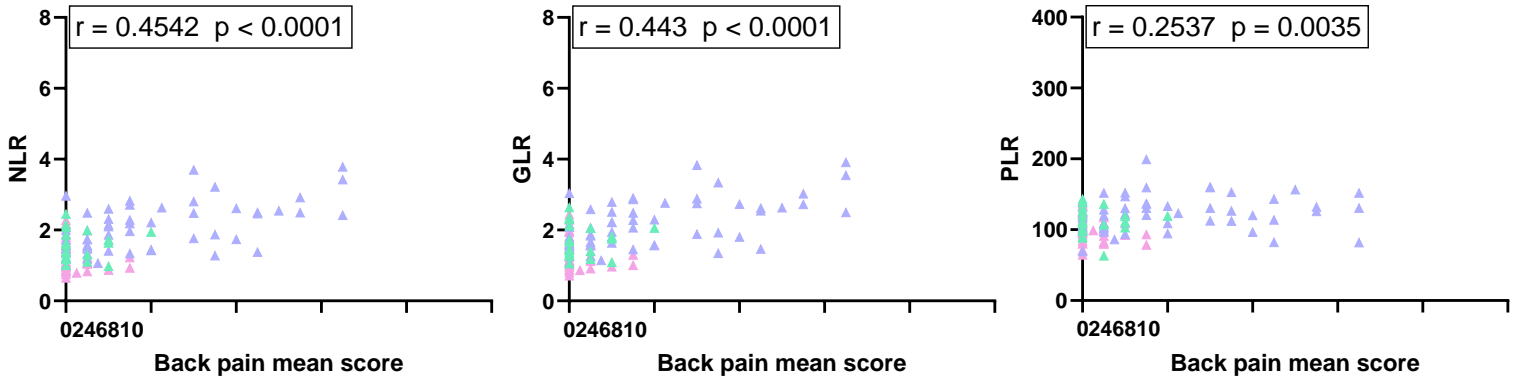
Figure 5

Men

A.



B.



C.

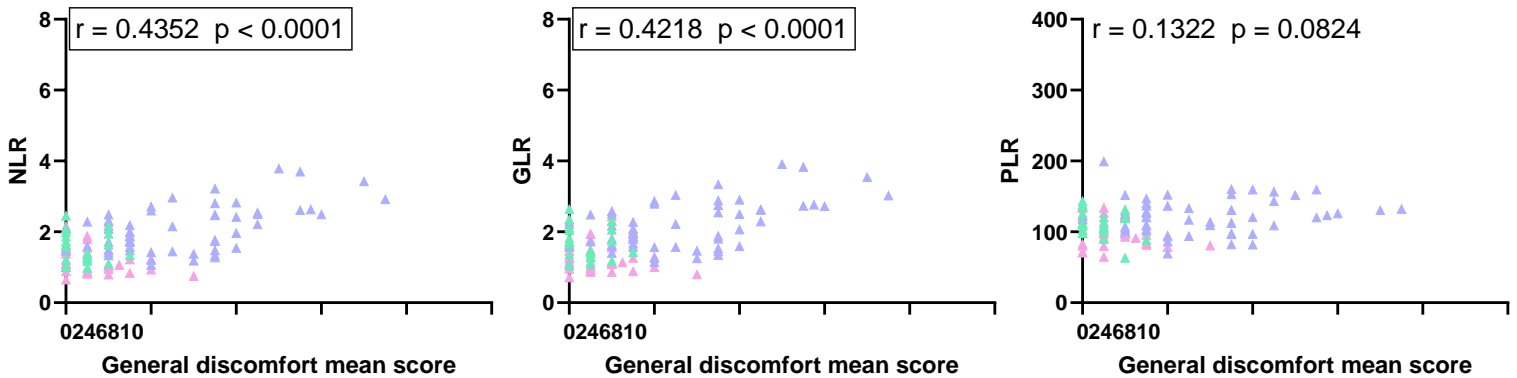




Figure 6

# Women

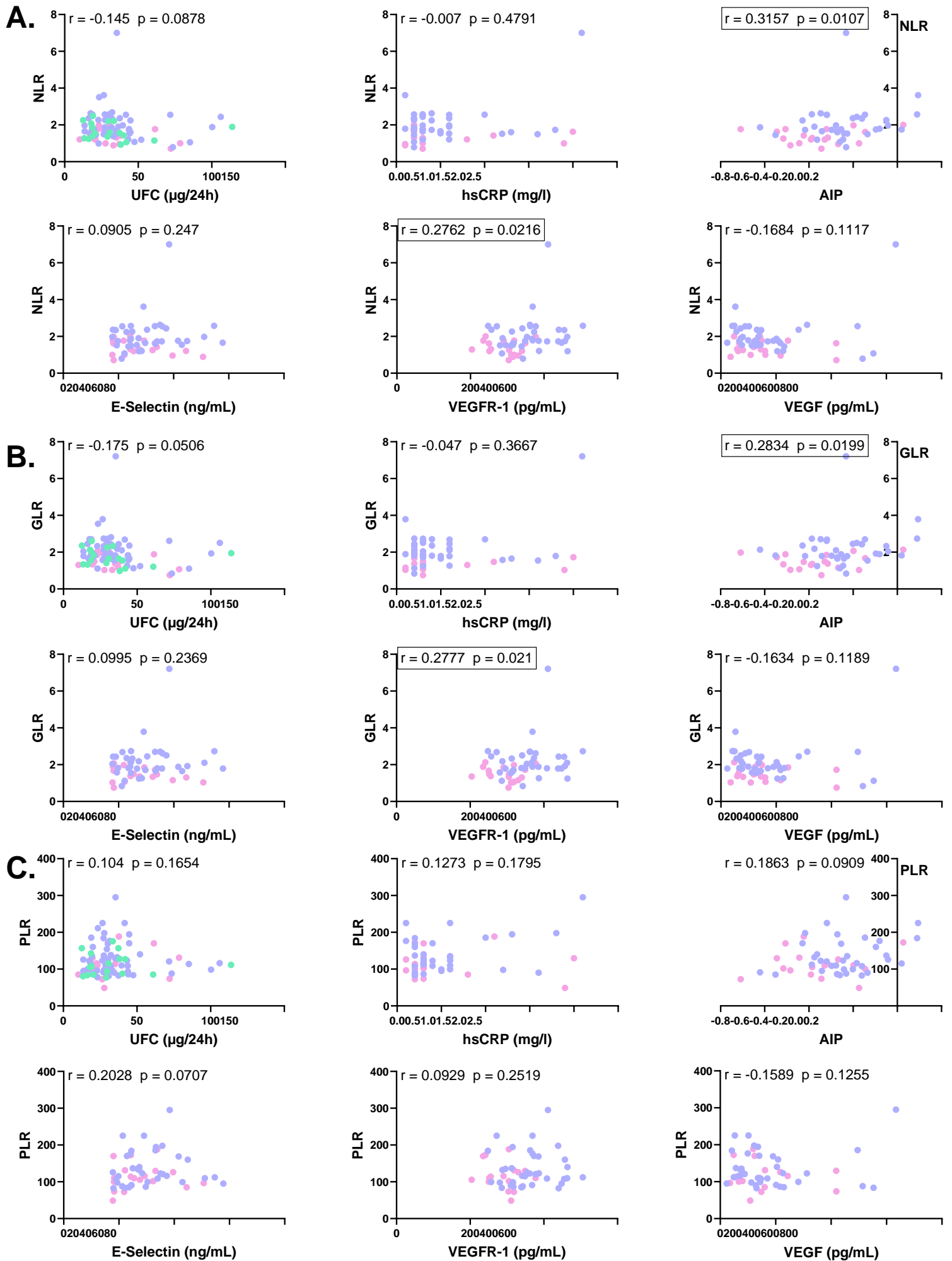




Figure 7

Men

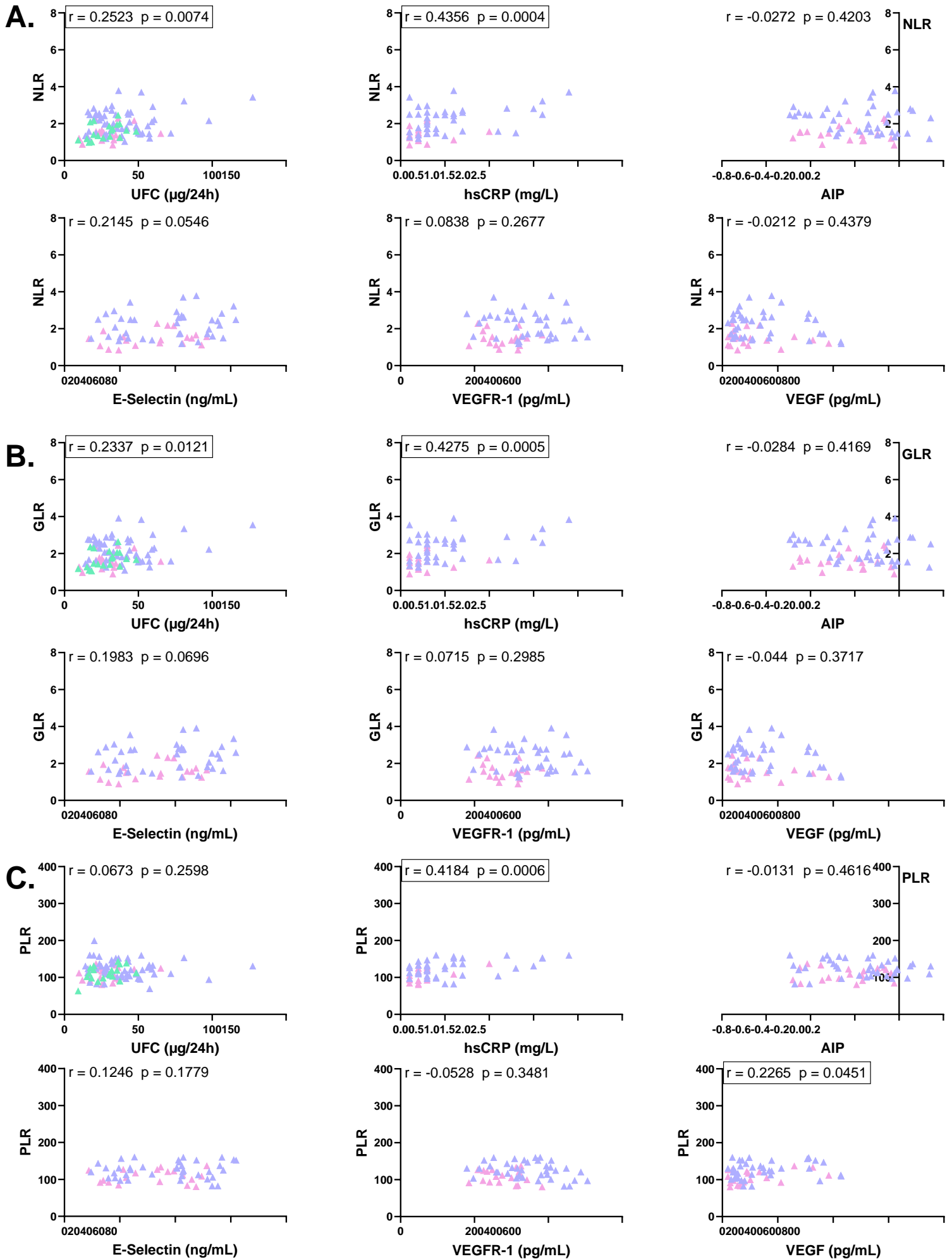
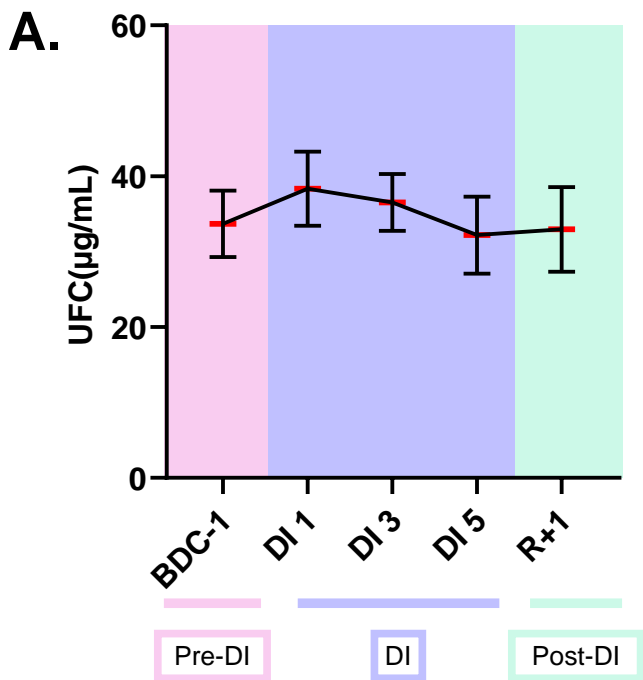


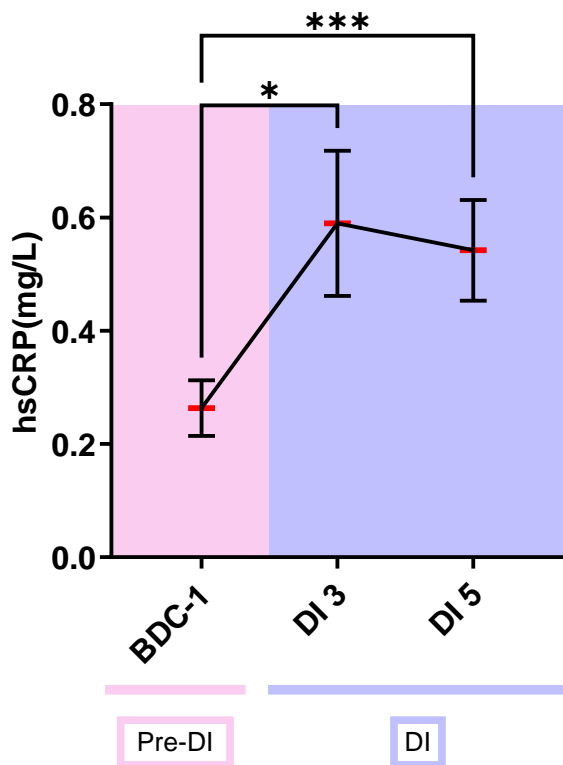
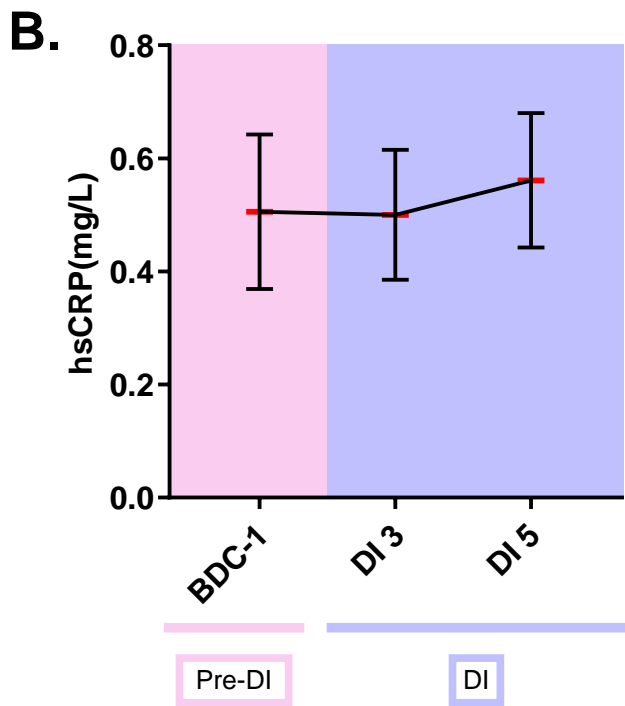
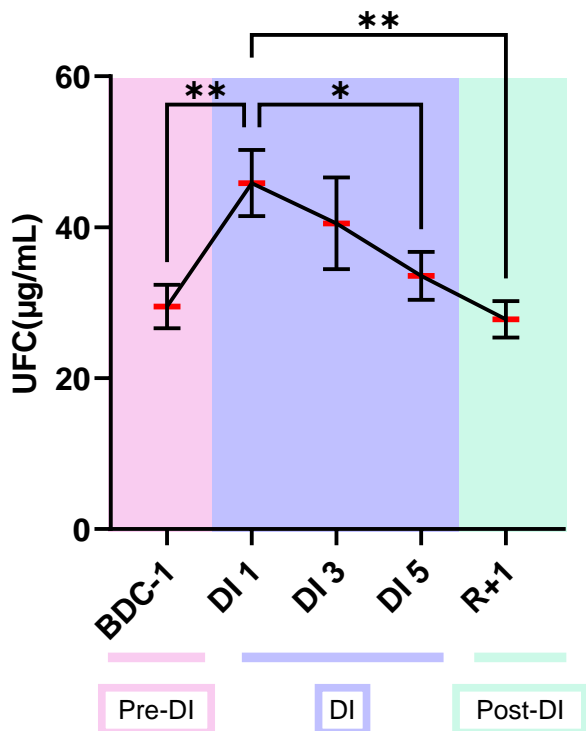


Figure 8

## Women



## Men



	Souris HU	Souris âgées	Neumayer III	Concordia	Espace	
Nb de LB	↓ des pro- B ↓ des pré-B	↓ des pro- B ↓ des pré-B	/	/	↑ à R+1 pour 40% des cos	
Stress	/	/	/	↑ Au cours de l'hivernage	↑ à R+1 pour 40% des cos	
Productivité des séquences	/	/	/	/	/	
<b>Boucles CDR3</b>	Longueurs	/	↑	/	/	
	Composition	Variation des CDR3 de 11-14 aa	Variation des CDR3 de 11-14 aa	2 groupes : N+ et N-	2 groupes : C+ et C- Variation ++	Concernent 40% des cos
<b>Fréquence d'utilisation</b>	IGHV	Variation des V distaux	Variation des V distaux et médiens	≠ entre les groupes N+ et N-	≠ entre les groupes C+ et C-	Variation
	IGHD	/	Variation	/	/	/
	IGHJ	/	/	/	/	/
Associations VDJ	Variation	Variation	≠ entre les groupes N+ et N-	≠ entre les groupes C+ et C-	≠ cos- contrôles	
<b>Enzymes spécifiques de la recombinaison V(D)J</b>	RAG	↓ des transcrits	↓ des transcrits Activité modifiée sur les segments D	Activité modifiée sur les segments V ≠ entre N- et N+	Activité modifiée sur les segments V ≠ entre C- et C+	Activité modifiée sur les segments D et J
	TdT	↓ des transcrits	↓ des transcrits Activité modifiée	≠ entre N- et N+	Activité modifiée au cours du temps	Variation pour 40% des cos à certains points de mesure
	Artémis	/	Activité modifiée entre IGHD et IGHJ	/	/	/
Footprints	/	/	/	/	Activité modifiée pour C+	/

**Tableau 7 : Récapitulatif des résultats obtenus comparés à ceux des cosmonautes (cos).**

Similarités et différences entre les résultats obtenus avec les différents modèles (souris soumises une hypokinésie des membres postérieurs (HU), souris âgées, individus ayant hivernés à Neumayer III ou à Concordia) et ceux obtenus lors de l'étude du répertoire d'Ac des cosmonautes (cos).

/ indique qu'il n'y a pas de changement.

## Discussion

### I. Effet des stress sur le répertoire d'anticorps

Durant mon doctorat, j'ai montré que les 3 modèles étudiés impactent le répertoire d'anticorps et plus particulièrement la composition en aa des boucles CDR3 qui contribuent de façon majeure à la reconnaissance antigénique. Les effets de ces stress ont été observés à la fois au niveau des choix des segments géniques d'Ac et au niveau des activités enzymatiques des acteurs de la recombinaison V(D)J (Tableau 7).

#### 1. Effets des stress sur la recombinaison V(D)J

Comme nous l'avons vu dans ces différentes études, les modifications des associations VDJ et l'utilisation des segments IGHV contribuent à la modification des répertoires d'Ac. Ces résultats suggèrent que différents types de stress peuvent impacter ces paramètres. En effet, nous avons étudié d'une part le stress microgravitaire et d'autre part des combinaisons de stress, sur des espèces différentes.

Les résultats obtenus dans nos modèles d'étude sont similaires à ceux obtenus dans l'étude pilote menée sur des cosmonautes. En effet, il a également été observé une modification des associations VDJ ainsi qu'une modification de la composition en aa des CDR3. Cependant, contrairement aux résultats obtenus avec les modèles HU, Concordia et Neumayer III, qui suggèrent que les stress impactent l'utilisation des segments IGHV, ce paramètre n'est pas altéré lors des vols spatiaux malgré une modification des répertoires des individus concernés (Buchheim et al., 2020). Cette différence pourrait être expliquée par la différence des combinaisons de stress, mais Concordia reste un modèle très proche de l'exposome spatial. Une autre hypothèse pourrait être la différence de répertoire des cosmonautes avant le vol par rapport à ceux d'individus lambda. En effet, nous avons montré que le remplacement d'IGHV lors de la recombinaison est plus important chez les cosmonautes avant le vol que chez des individus contrôles (Buchheim et al., 2020). Ce phénomène pourrait compenser la modification de l'utilisation des segments IGHV. De façon intéressante, le remplacement des segments IGHV est augmenté chez les hibernants 'hauts répondeurs', suggérant une altération de la fonctionnalité des recombinaisons dans des environnements extrêmes. Il est donc envisageable que l'exposome spatial modifie les remplacements d'IGHV mais que ce phénomène ne soit pas observable chez les astronautes, cette activité étant de base plus élevée chez eux probablement à cause de leur entraînement.

De plus, nous avons observé que les stress rencontrés dans des environnements extrêmes (Neumayer III et Concordia) impactent les activités des enzymes RAG1/2 et TdT à l'inverse du modèle HU. Ces activités enzymatiques sont également affectées chez des cosmonautes lors de missions de longues durées (Buchheim



et al., 2020). Ces modifications ne seraient donc pas dues à la microgravité mais aux autres combinaisons de stress.

## 2. Cohérence des résultats avec la théorie du 'spaceinflammageing'

Nous avons noté que les modifications des associations VDJ chez les souris âgées sont similaires à celles observées chez les souris HU ou chez des individus exposés à des stress intenses. En accord avec ces observations, des études menées chez l'Homme ont montré une modification de l'utilisation des segmentsIGHV et IGH D (Rodriguez-Zhurbenko et al., 2019) et une diminution de la diversité du répertoire d'Ac (Tabibian-Keissar et al., 2016) chez les personnes âgées en comparaison à des sujets jeunes. En revanche, concernant les activités enzymatiques, si les effets sont similaires entre le vieillissement et les environnements extrêmes (Concordia, Neumayer III et vols spatiaux), aucun effet n'a été observé chez les souris HU. Ces résultats laissent supposer que les environnements extrêmes auraient un effet plus important que la microgravité. Cependant, le modèle HU reste un modèle de traitement court par rapport au temps de vols des astronautes (6 mois) ou encore à un hibernage (1 an). En effet, bien que la durée de 21 jours ait été définie par équivalence avec la durée de vie de la souris, l'expérience se déroule sur un temps réduit ce qui peut limiter l'apparition d'effets à long terme. Dans le modèle HU, une diminution du pourcentage de cellules pro-B et pré-B est visible dès 3 jours (Lescale et al., 2015). Ainsi, il est possible qu'une modification du répertoire d'anticorps s'établisse très vite après le début de la suspension et qu'en conséquence les effets de la microgravité soient effectivement plus faibles que ceux des stress. Afin de confirmer ou d'infirmier l'impact de la microgravité sur le répertoire d'anticorps chez l'Homme, l'analyse de celui-ci dans d'autres modèles seraient intéressantes, notamment sur lors de l'exposition aux modèles HDTBR ou DI, qui sont des modèles humains se déroulant sur un temps long pour le BedRest et généralement plus court pour la Dry Immersion.

Enfin, nous ne pouvons pas exclure que les stress pris individuellement aient moins d'effets que des combinaisons de stress, ce qui pourrait expliquer les différences de réponses observées entre les souris HU, les environnements extrêmes, et le vieillissement.

Pris globalement, ces données suggèrent un vieillissement accéléré au niveau de la formation du répertoire d'Ac lors de l'exposition à des stress et sont en accord avec la théorie du 'space-inflammageing' selon laquelle l'exposome spatial agirait comme accélérateur du vieillissement (Capri et al., 2023; Strollo and Vernikos, 2021). Afin de confirmer ce parallèle, il serait intéressant d'étudier l'effet du vieillissement sur les activités des enzymes de la recombinaison V(D)J. Aucune étude, à notre connaissance, n'ayant été menée dans ce sens.



En conclusion, nos études sur des modèles différents nous ont permis d'apporter des informations complémentaires sur les conséquences des stress sur la formation du répertoire d'anticorps et toutes suggèrent que le stress induirait un vieillissement accéléré de ce répertoire.

### **3. Effets individus-dépendants**

Dans les modèles d'environnements extrêmes, Neumayer III et Concordia, deux groupes d'individus ont à chaque fois été identifiés : un groupe à réponse forte (C+ et N+) et un groupe à réponse faible (C- et N-) avec environ 40% des individus dans les groupes C+ et N+. Ce pourcentage correspond à celui des astronautes présentant des modifications immunitaires après un vol (Crucian et al., 2018; Kimzey et al., 1976) ainsi qu'à celui des cosmonautes présentant des modifications du répertoire d'Ac (Buchheim et al., 2020). Dans le cas du modèle HU, nous n'avons pas observé de hauts ou bas répondeurs, ce qui peut s'expliquer par le fait que nous avons travaillé avec une lignée de souris consanguine, limitant la variabilité génétique. Pour déterminer si la différence de réponse observée au niveau des répertoires d'Ac est due à des différences géniques, il serait intéressant d'exposer des souris de lignées non consanguines au modèle HU. Ces analyses pourraient potentiellement permettre de déterminer les facteurs induisant ces différences de réponse et déterminer si des prédispositions existent. La modification du répertoire d'Ac pouvant être due à des altérations de la lymphopoïèse B, il serait aussi intéressant de l'étudier chez ces souris non consanguines soumises au HU.

## **II. Impact sur le nombre de cellules**

### **1. Impact sur le nombre de lymphocytes B**

En accord avec les données publiées par Lescale et collaborateurs, nous avons observé une baisse des cellules pro-B et pré-B dans la moelle osseuse des souris HU. Cette diminution semble impacter les stades de différenciation suivants (LB immatures et LB matures dans la moelle osseuse) (Lescale et al., 2015). De façon intéressante, une diminution des LB matures dans la rate a été rapportée chez des souris HU (Gaignier et al., 2014), laissant supposer une diminution des LB circulants, mais ce dernier point n'a pas été étudié chez la souris HU à notre connaissance. Une étude a montré que le nombre total de lymphocytes circulants reste constant après 14 jours de HU (Paul et al., 2020). Cependant, il n'est pas possible d'exclure que les nombres de LT versus LB varient de façon opposée dans le sang des souris HU. Une étude menée chez des hommes adultes alités pendant 2 mois lors du 'bed-rest cocktail', n'a pas mis en évidence de modification de l'homéostasie B dans le sang circulant (Bonney et al., 2022). Ces données sont en accord avec les analyses réalisées sur des astronautes au cours de missions de courtes ou longues durées (Spielmann et al., 2019b). Nous n'avons pas pu mesurer le nombre de LB circulants chez les hivernants de Concordia et Neumayer III, mais des études précédentes ont montré une légère augmentation de ceux-ci au cours du temps (Feuerrecker



et al., 2019; Strewé et al., 2019). Pris ensemble, ces données suggèrent que l'homéostasie B est peu modifiée dans le sang périphérique.

## **2. Impact sur les neutrophiles, plaquettes et lymphocytes**

L'intérêt des biomarqueurs NLR, GLR et PLR a été confirmé dans les modèles de microgravité simulée HDTBR et DI.

L'augmentation des ratios NLR et GLR lors des études d'HDTBR et de DI peut être expliquée par une augmentation des neutrophiles/granulocytes et/ou une diminution des lymphocytes. Selon l'étude publiée sur le même bed-rest que celui utilisé pour étudier les ratios NLR, GLR et PLR, le nombre total de lymphocytes n'est pas modifié, ni le nombre de LB (Bonney et al., 2022). Le nombre de neutrophiles, quant à lui, augmente particulièrement à R+1. Ces résultats montrent que l'HDTBR impacte le nombre de neutrophiles mais pas de lymphocytes. Concernant la dry-immersion, des résultats similaires ont été obtenus. En effet, Robin et collaborateurs ont montré que les neutrophiles augmentent au cours du temps mais que le nombre de lymphocytes reste stable (Robin et al., 2023). Le fait que 50-70% des granulocytes soient des neutrophiles explique l'augmentation du ratio GLR. De la même manière, le modèle HU induit une augmentation des neutrophiles et par conséquent du NLR (Paul et al., 2020). Ainsi, les modèles de microgravité appliqués à l'humain et à la souris semblent avoir les mêmes conséquences au niveau cellulaire qu'un vol spatial (Paul et al., 2020), suggérant que le stress microgravitaire peut impacter à lui seul le nombre de neutrophiles.

Concernant le PLR, du fait que le nombre total de lymphocytes ne varie pas, nous pouvons supposer que ce sont les plaquettes qui augmentent. Bien que la cinétique d'augmentation des ratios soit différente entre les modèles HDTBR et DI, il est intéressant de constater que les valeurs maximales sont très proches. Il y aurait donc un décalage de l'augmentation du ratio PLR dû à la différence de cinétique d'induction de la microgravité entre ces modèles, la DI ayant des effets beaucoup plus rapides que l'HDTBR.

Concernant les modèles Antarctique, aucune donnée n'existe à notre connaissance sur ces ratios. Chez les hivernants de Neumayer III, il a été noté une augmentation significative au cours du temps des granulocytes, avec un pic à l'arrivée dans la base (Strewé et al., 2019). Le pourcentage global de lymphocytes augmente également, mais nous ne savons pas si ces augmentations ont un impact sur les ratios NLR et GLR.

Il apparaît donc que plusieurs types cellulaires, tous issus de la moelle osseuse, sont impactés par le stress microgravitaire ou par une combinaison de stress.

## **III. Impact sur l'hématopoïèse**

La moelle osseuse est le lieu de l'hématopoïèse. Une ou plusieurs perturbation(s) de ce mécanisme pourraient expliquer les résultats que nous avons obtenus dans nos différents modèles. En effet, Lescalet et



collaborateurs (2015) ont mis en évidence une diminution significative des CLP mais pas des MPP ni des LMPP. De plus, l'augmentation des neutrophiles chez les souris HU (Paul et al., 2020), associée aux données sur la lymphopoïèse B, suggère une possible modification de l'hématopoïèse en faveur de la lignée myéloïde et au détriment de la lignée lymphoïde.

Il a été montré que les capacités de survie, de prolifération et de différenciation des CSH semblent impactées par la microgravité simulée (s0G). En effet, des CSH humaines CD34<sup>+</sup> cultivées en s0G prolifèrent environ 3 fois moins qu'en normo gravité (Plett et al., 2001). Cette observation est associée à une diminution de l'expression de SCF, un facteur essentiel au bon maintien des CSH (Plett et al., 2004). De plus, une analyse RNA-seq réalisée sur des CSH murines cultivées pendant 12 jours à bord des satellites Thanzou-1 et SJ-10 (Wang et al., 2019) a révélé une baisse du marqueur de prolifération Ki67 ainsi qu'une surrégulation des gènes liés à l'apoptose et au stress hypoxique. Enfin, l'analyse protéomique de CSH isolées de sang humain et cultivées à bord de l'ISS a mis en évidence une réduction des marqueurs de la pluripotence (comme Nanog) associée à une augmentation des marqueurs de répression transcriptionnelle telles qu'H3K9me3 et H3K27me3, suggérant une réduction des capacités de différenciation des CSH en microgravité. (Gambacurta et al., 2019). Ces données suggèrent donc que le nombre de CSH dans la moelle osseuse et leur capacité de différenciation seraient réduits en microgravité, ce qui est contradictoire avec les données obtenues par Lescale et collaborateurs *in vivo*. S'il y a une altération de la survie et de la prolifération des CSH dans la moelle osseuse, ce phénomène semble minime car il n'a pas pu être détecté dans l'étude de Lescale et al. (Lescale et al., 2015). Ces données mettent en évidence les limites des études *in vitro*. En effet, dans ces conditions, les CSH ne sont plus en contact avec leur environnement médullaire. Or, cet environnement est essentiel à leur régulation. Nous pouvons donc supposer que la régulation fine de l'environnement médullaire ait permis de contrecarrer les effets négatifs du stress microgravitaire *in vivo*.

Comme nos résultats l'ont montré chez les souris HU, l'exposition à un stress microgravitaire induit une diminution du nombre de cellules pro-B et pré-B ainsi qu'une modification du répertoire d'anticorps. De façon intéressante, comme nous venons de le voir, la microgravité induit une augmentation des marques répressives H3K9me3 et H3K27me3 (Gambacurta et al., 2019). Nous pouvons supposer que ces modifications se maintiennent dans les stades plus tardifs de différenciation, dont les stades pro-B et pré-B, et pourraient impacter la recombinaison V(D)J. En accord avec cette hypothèse, le laboratoire a montré que le stress hypergravitaire induit une augmentation d'H3K27me3 sur des régions précises du locus *TCRB* (dont le mécanisme de recombinaison V(D)J est identique à celui du locus *IGH*) au niveau de segments V $\beta$  (Calcagno et al., 2022). Ces modifications pourraient expliquer les modifications du répertoire TCR $\beta$  observées chez des souriceaux conçus, développés et nés en hypergravité (Ghislin et al., 2015).



## IV. Structure osseuse

### 1. Perte osseuse et conséquences

La microarchitecture osseuse joue un rôle important dans l'hématopoïèse. Il est donc possible que son altération contribue à la dérégulation de l'hématopoïèse. En effet, si cette structure est modifiée alors les niches endostéales peuvent l'être également et par conséquent l'hématopoïèse. Il a été montré qu'un astronaute peut perdre jusqu'à 20% de sa masse osseuse (LeBlanc et al., 1998; Vico et al., 2000). Le déséquilibre entre formation et résorption osseuse peut donc affecter les niches endostéales. De façon intéressante, Lescale et collaborateurs ont montré qu'après 21 jours de HU, la sOG induit des changements de la microarchitecture du tibia, qui sont similaires mais moins importants que celles produites par l'âge (Lescale et al., 2015). Le modèle HDTBR induit également une diminution de la densité moyenne de l'os ainsi qu'une perte de masse osseuse. Mais les analyses indirectes réalisées dans cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence une modification de la lymphopoïèse B ni de l'hématopoïèse, laissant supposer que les changements ne sont pas assez forts pour modifier ces mécanismes (Jacob et al., 2022). La DI, quant à elle, induit très rapidement une perte de masse osseuse avec un déséquilibre entre formation et résorption osseuse au bout de 2 jours (Linossier et al., 2022). Cependant, après ces deux jours de DI, il semble y avoir un pic d'adaptation qui se maintient par la suite pouvant permettre un rééquilibrage de la balance entre formation et résorption osseuse. Il semble donc que l'effet sur la lymphopoïèse B et l'hématopoïèse puisse être différents selon les modèles utilisés pour mimer la microgravité chez l'homme.

### 2. Résorption osseuse et vieillissement

L'étude des souris ayant volé un mois à bord du satellite BION-M1a mis en évidence une augmentation de la résorption osseuse, une modification des propriétés mécaniques des os, une augmentation de la mort des ostéocytes et du nombre d'adipocytes présents dans la moelle osseuse (Gerbaix et al., 2017). La résorption osseuse due à la OG peut donc provoquer une diminution/déstructuration des niches hématopoïétiques, ce qui impacterait négativement la lymphopoïèse B. En condition de normo gravité, la charge affectée sur les os permet de donner une certaine rigidité structurale aux niches, essentielle au bon fonctionnement du tissu et à ses différentes fonctions. La OG ou sOG enlève complètement ou partiellement la masse qui est normalement appliquée sur l'os. Ces conditions ne sont pas spécifiques aux vols spatiaux, elles sont aussi associées aux modes de vie sédentaires comme dans les bases en Antarctique (telles que Neumayer III et Concordia) et aux modèles de microgravité simulée humains et murins (Özçivici, 2013). De plus, la résorption osseuse observée en conditions spatiales est accompagnée d'une augmentation du nombre d'adipocytes qui va remplacer la perte osseuse engendrée (Gerbaix et al., 2017; Özçivici, 2013). Cette augmentation d'adipocytes est aussi retrouvée dans les modes de vie sédentaires, telles que les hivernages, dans les modèles de microgravité comme l'HDTBR et le HU (Özçivici, 2013), et est typique du vieillissement.



Ces altérations osseuses, induites par l'inactivité physique et les modèles de sOG, pourraient donc provoquer une altération des niches hématopoïétiques ce qui réduirait le nombre de progéniteurs, leurs possibilités de différenciation ou encore leur statut épigénétique. Ceci pourrait, entre autres, affecter la production des cellules B et la recombinaison V(D)J. Enfin, comme dit ci-dessus, l'augmentation du nombre d'adipocytes et d'ostéoclastes est aussi spécifique du vieillissement renforçant l'hypothèse du 'space-inflammaging' causé par les différents modèles (Gerbaix et al., 2017).

## V. Stress et effets psychologiques

Dans chaque modèle, le niveau de stress a été évalué via la quantification de la corticostérone sérique chez les souris et du cortisol sérique chez les humains. Les souris n'ont montré aucun changement du taux de corticostérone bien qu'il n'ait été mesuré qu'en fin d'expérimentation. Le stress s'est donc sûrement auto-régulé comme décrit dans l'introduction. Les volontaires soumis au HDTBR n'ont pas non plus présenté de changements significatifs au cours du temps (Bonney et al., 2022) contrairement à ceux soumis à la DI qui ont présenté une augmentation du cortisol mais uniquement chez les hommes. Cette observation renforce l'idée que la DI a un effet plus sévère sur l'organisme que l'HDTBR. Concernant les hivernants, nous avons détecté une augmentation significative du cortisol lors des hivernages à Concordia mais pas à Neumayer III. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que Concordia est un environnement bien plus extrême que Neumayer III. Cependant, l'hivernage à Neumayer III ayant eu lieu en 2021, il est possible que les confinements dus au COVID-19 aient en quelque sorte 'entraînés' les hivernants, les rendant moins sensibles aux stress de confinement et d'isolement extrêmes présents à Neumayer III. En effet, les confinements dus au COVID-19 présentent de nombreuses similitudes avec les stress de confinement et d'isolement extrêmes vécus par les hivernants ou les astronautes (Choukér and Stahn, 2020). Concernant les modèles humains, il aurait été intéressant de rechercher des corrélations entre les concentrations de cortisol, les évaluations psychologiques permettant d'évaluer le stress ressenti, et les changements de NLR, GLR, PLR ou de répertoire d'Ac.

En effet, les changements observés chez les hivernants pourraient être, au moins en partie, dus à un effet psychologique des stress chroniques sur le système immunitaire. Il n'est d'ailleurs pas étonnant que l'activité motrice des hivernants soit réduite. En effet, il existe dans ces bases un phénomène psychologique appelée 'hibernation psychologique' (Sandal et al., 2018). L'impact trop important des nombreux stress physiques et socio-environnementaux engendrerait une augmentation de la fatigue, des changements d'humeur et une moindre motivation similaire à un syndrome dépressif. Il y a donc très probablement un impact psychologique sur l'état immunitaire des hivernants. Un hivernage à Neumayer III a d'ailleurs mis en évidence une augmentation du stress psychologique qui ne fut pas significative sûrement à cause de la subjectivité des réponses (Strewe et al., 2019). Cette subjectivité et la mentalisation du stress peut aussi expliquer la



différence entre hommes et femmes soumis à la DI et la différence de réponse entre DI et HDTBR. En effet, l'HDTBR étant plus long, les participants peuvent s'adapter au cours du temps ce qui n'est pas possible lors d'un DI de courte durée. La différence due au sexe a par ailleurs été retrouvée chez des souris soumises à un stress hypergravitaire (2G), les males présentant une augmentation significative du taux de corticostérone sérique ce qui n'est pas le cas des femelles (Ghislin et al., 2015).

Nous avons vu que les modèles peuvent impacter différemment la structure osseuse et le nombre de cellules immunitaires. Ceci est probablement dû à l'intensité et la nature des stress associés à chaque modèle (HDTBR vs DI vs stress socio-environnementaux extrêmes). Il apparaît donc que les altérations de l'os pourraient contribuer à une modification de l'hématopoïèse, mais que d'autres facteurs, notamment la perception du stress, pourrait également y contribuer. La combinaison de ces différents facteurs pourrait ainsi impacter les capacités de défense des individus.

## **VI. Statut immunitaire**

### **1. Neutrophiles**

L'augmentation des neutrophiles, qui représentent la grande majorité des globules blancs et sont un composant majeur de l'immunité innée, est potentiellement un élément compromettant pour le SI. Bien qu'il semble que leur capacité phagocytaire soit diminuée après un vol spatial (Jacob et al., 2023), les neutrophiles sont aussi connus pour libérer des espèces réactives à l'oxygène (ROS) afin de dégrader les pathogènes. En cas d'activation du SI inné, un excès de neutrophiles pourrait engendrer une libération trop importante de ROS ce qui pourrait être délétère pour l'organisme puisque les ROS peuvent être responsables de dégâts cellulaires importants en attaquant de nombreux composants cellulaires (lipides, acides nucléiques) ce qui pourrait mener à une réaction inflammatoire excessive.

### **2. Lymphocytes B et répertoire d'anticorps**

La quantification des isotypes d'Ac n'a montré aucun changement significatif chez les hivernants au cours du temps. Ce n'est pas étonnant vu que les stations Concordia et Neumayer III sont situées des zones quasiment dépourvues d'Ag. Cependant, ces données permettent de confirmer que les changements de répertoire observés sont dus aux combinaisons de stress et pas à une réponse immunitaire provoquée par un Ag. De plus, cette absence de variation lors des hivernages laisse supposer que les fonctions effectrices des Ac ne sont pas touchées. En conditions spatiales, il n'y a pas non plus de changement des taux d'isotypes au cours du temps (Spielmann et al., 2019b) suggérant qu'aucune de ces combinaisons de stress n'impacte les concentrations plasmatiques d'isotypes. Cependant, il est possible que les changements de répertoire d'Ac



puissent affecter l'immunité humorale. En effet, nous avons mis en évidence d'importantes modifications des séquences CDR3 qui sont des contributeurs majeurs au site de liaison à l'Ag. La reconnaissance de l'Ag par l'Ac pourrait donc être modifiée et être soit moins efficace soit mal-efficace conduisant par exemple au développement de maladies auto-immunes ou d'allergies. En accord avec cette dernière hypothèse, des analyses réalisées lors de précédents hivernages à Concordia ont mis en évidence une modification de la réponse des LB après stimulation *in vitro* résultant en une hyperactivation des LB et un statut pro-inflammatoire (Feuerecker et al., 2019). De plus, des études ont montré une modification de profils allergiques après l'hivernage. En accord avec nos observations, les effets allergiques seraient individus-dépendants, confirmant nos résultats selon lesquels, les adaptations à un environnement extrême sont variables entre individus (Feuerecker et al., 2022). Dans notre cas, nous n'avons malheureusement pas pu quantifier les IgE dans nos échantillons par manque de volume de sérum. Une autre étude a montré que des souris BALB/c allergiques ou non soumises au modèle HU présentaient une augmentation des allergies à l'ovalbumine par rapport aux souris contrôles. De plus, il a été montré une aggravation des pathologies chez les souris allergiques dans ces conditions (Jang et al., 2015).

L'ensemble de ces résultats laisse supposer que des stress individuels ou des combinaisons de stress pourraient avoir des conséquences sur la réponse immunitaire humorale même en l'absence de modification du nombre de LB. En effet, l'absence de modification du nombre de cellules B n'exclut pas des modifications des répertoires d'anticorps comme l'a montré l'étude préliminaire menée sur 5 astronautes. Ainsi, il est important d'avoir plusieurs échelles d'analyses, cellulaires et moléculaires, quantitatives et qualitatives, pour évaluer l'impact des stress sur le SI et plus particulièrement sur l'immunité humorale. Il est également important de maintenir une surveillance des individus après l'exposition aux stress car la majorité des modifications, si elles ne semblent pas avoir de conséquences immédiates, peuvent impacter les individus après un retour à une vie normale.



## CHAPITRE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Il est aujourd'hui établi que l'exposome spatial, composé d'une combinaison unique de stress physiques et socio-environnementaux, impacte négativement tous les systèmes physiologiques dont le système immunitaire. Cet exposome induit de nombreuses modifications immunologiques pouvant mener au développement de pathologies (Jacob et al., 2023). Les missions vers la Lune comme le projet 'Lunar Gateway' ou les missions vers Mars, ainsi que l'essor du tourisme spatial font montre d'un besoin de caractériser plus spécifiquement ces modifications du SI et plus particulièrement celles liées à l'immunité humorale, actuellement peu étudiées. De plus, l'essor de ces programmes spatiaux nécessitera un suivi des astronautes afin de monitorer leur état de santé, déterminer quand il faut appliquer une contremesure et suivre l'efficacité de celle-ci. Il est donc crucial de définir des biomarqueurs faciles à utiliser, à interpréter et peu onéreux. Cependant, l'étude d'échantillons d'astronautes est limitée par l'accès à ces échantillons et le peu d'astronautes. Afin de palier à ces limitations, divers modèles mimant une partie des stress composant l'exposome spatial ont été développés. Ainsi, lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés à 5 modèles de l'exposome spatial : le modèle d'hypokinésie des membres postérieurs (HU) chez la souris, deux modèles d'environnements extrêmes terrestres (séjours dans les bases Antarctiques Neumayer III et Concordia), et deux modèles humains de microgravité simulée à savoir la 'dry-immersion' (DI) et le 'head-down tilt bed-rest' (HDTBR). Chaque modèle recrée une combinaison de stress trouvée dans l'exposome spatial avec une intensité et une durée précises.

Afin de déterminer l'impact du stress microgravitaire sur le répertoire d'anticorps, nous avons soumis des souris à 21 jours d'hypokinésie des membres postérieurs. Nous avons ainsi mis en évidence un changement du répertoire d'Ac, avec une diminution des progéniteurs des LB dans la moelle osseuse, sans changement des acteurs de la recombinaison V(D)J. Nous avons, par la même occasion, comparé ces résultats à ceux obtenus chez des souris âgées et avons mis en évidence une similarité entre les deux modèles bien que l'effet du modèle HU soit beaucoup moins sévère sur le répertoire d'Ac et la lymphopoïèse B. Cette étude renforce la théorie du 'space-inflammaging' qui décrit l'exposome spatial comme un accélérateur du vieillissement (Capri et al., 2023). Bien que la durée de 21 jours semble être l'équivalent d'un voyage spatial de 6 mois pour la souris, ces 21 jours de suspension ne sont peut-être pas suffisants pour mimer complètement les effets du vieillissement. Pour vérifier cette hypothèse, il conviendrait de soumettre des souris à une hypokinésie des membres postérieurs de plus de 21 jours et d'observer les effets sur le répertoire d'Ac et la lymphopoïèse B. Il conviendrait également de déterminer si les changements observés sont réversibles et si oui après combien de temps. De plus, il serait intéressant d'étudier les effets du modèle HU sur les hypermutations somatiques qui complètent la diversité des Ac créé dans la moelle osseuse. En effet, des données publiées par le



laboratoire ont mis en évidence une diminution de la fréquence de ces mutations chez deux amphibiens adultes immunisés lors d'une mission de 5 mois à bord de la station spatiale Mir (Bascope et al., 2011). Enfin, le modèle HU ne reproduit que le stress microgravitaire, il serait intéressant de comparer nos données avec un modèle de stress socio-environnementaux. Le modèle CUMS utilisé pour mimer les stress socio-environnementaux rencontrés en vol est un bon candidat pour étudier les effets de ce type de stress sur le répertoire d'Ac. En effet, le laboratoire a montré que l'exposition de souris gestantes au CUMS induit un changement de 25% du répertoire TCR $\beta$  et augmente la fréquence de CDR3 autoréactifs chez les souriceaux (Fonte et al., 2019). Il se pourrait donc que le répertoire d'Ac soit également affecté par de tels stress.

Afin d'identifier la combinaison de stress qui impacte le plus le répertoire d'Ac, nous nous sommes ensuite intéressés aux modèles d'environnements extrêmes terrestres analogues de l'ISS : les bases Antarctiques Neumayer III et Concordia. Les participants ayant hivernés un peu moins d'un an dans ces bases ont été soumis à des combinaisons spécifiques de stress physiques et socio-environnementaux. L'étude de ces volontaires sains nous a permis de montrer qu'environ 40% d'entre eux réagissent fortement aux hivernages et de façon bien plus forte encore pour les hivernants de Concordia. Ce résultat est particulièrement intéressant puisqu'environ 40 à 50% des astronautes présentent des modifications immunologiques à leur retour de mission (Crucian et al., 2016), montrant ainsi la haute fidélité de ces modèles. De plus, ces modèles ont mis en évidence un important effet des stress physiques et socio-environnementaux sur le répertoire d'Ac, associé à des modifications du mécanisme de recombinaison V(D)J, persistant pour certains individus jusque 6 mois après la fin de l'hivernage sous-entendant des conséquences sur le long terme et une potentielle modification de la reconnaissance Ac-Ag. Enfin, la comparaison des résultats Neumayer III / Concordia a montré l'importance du stress hypoxique sur le répertoire d'Ac. Afin de compléter cette étude, il serait intéressant d'aligner les séquences CDR3s des volontaires ayant hiverné dans Neumayer III ou Concordia avec toutes les séquences connues de CDR3s impliqués dans de l'auto-réactivité car il a été montré que le stress hypoxique rend le répertoire d'Ac murin plus autoréactif (Burrows et al., 2020). Une autre façon d'aborder cette question serait d'utiliser le kit HuProt v3.0 Human Proteome Microarray de NEXTGEN Proteomics permettant de détecter un nombre important d'Ac auto-réactifs. De plus, il serait intéressant de comprendre pourquoi il y a deux types de réponse. A cette fin, et sachant l'importance des marques épigénétiques dans la régulation de la recombinaison V(D)J et la création du répertoire d'Ac, il serait intéressant de les étudier chez les hivernants afin de voir leur variation au cours du temps et de déterminer si certaines marques sont associées aux bons ou mauvais répondeurs. Une analyse du méthylome serait aussi judicieuse car des données publiées par le laboratoire ont mis en évidence une augmentation de l'expression la marque H3K27me3 sur le locus TCR $\beta$  de thymocytes murins soumis à un stress hypergravitaire. D'une façon plus générale, une étude transcriptomique des LB serait aussi pertinentement puisque des analyses transcriptomiques ont mis en évidence une modification de l'expression de gènes liées au SI chez les



astronautes lors de missions spatiales et chez des sujets soumis à 21 jours de DI (Gallardo-Dodd et al., 2023; Tierney et al., 2024). Enfin, dans notre étude nous n'avons pas déterminé si le sexe a une importance vu le faible nombre (trois) de femmes ayant séjourné dans Neumayer III. A l'avenir, il sera important de travailler sur des nombres équilibrés d'hommes et de femmes, comme nous avons pu le faire dans l'étude Vivaldi qui est beaucoup plus récente que les études en Antarctique.

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons évalué des biomarqueurs d'intérêt dans 2 modèles de microgravité simulée, l'HDTBR et la DI. L'HDTBR, appliqué uniquement à d'hommes, nous a permis de mettre en évidence une cinétique de changement des marqueurs NLR et GLR similaire à celle observée chez des astronautes, et d'évaluer le rétablissement de ces biomarqueurs après l'HDTBR. L'intérêt des biomarqueurs NLR et GLR a donc été confirmé dans ce modèle. Nous pensons le NLR et le GLR sont des biomarqueurs du stress physique. Nous avons également mis en évidence l'intérêt du PLR en tant que biomarqueur du statut immunitaire, notamment dans la prédiction de maladies immunitaires à long terme telles que les maladies auto-immunes. En effet, les valeurs de PLR observées suite au HDTBR étaient proches de celles notées chez des patients ayant des maladies auto-immunes telle que le lupus ou encore la polyarthrite rhumatoïde (Fu et al., 2015; Wu et al., 2016). Afin de le vérifier, il serait intéressant d'évaluer ce ratio chez des souris soumises à un HU de longue durée et de déterminer si l'évolution de ce marqueur est associée à un répertoire d'Ac plus autoréactif.

Nous avons également étudié ces ratios dans un autre modèle de microgravité simulée, la DI, dont l'étude portait sur un nombre similaire d'hommes et de femmes. Ce modèle a confirmé l'intérêt de ces ratios. Bien que la cinétique des changements fût différente de celle observée avec le modèle HDTBR, les valeurs maximales atteintes par ces ratios étaient similaires à celles observées lors du HDTBR et proches de celles notées chez les astronautes. De plus, nous avons mis en évidence des corrélations entre ces biomarqueurs et des marqueurs d'inconfort physique comme le manque de sommeil, les douleurs dorsales et le sentiment d'inconfort général confirmant que ces biomarqueurs sont des marqueurs de stress physique. Enfin, nous avons investigué les potentiels causes des changements de ces biomarqueurs en fonction du sexe. Nous avons ainsi montré que l'augmentation de ces biomarqueurs est associée au stress et à l'inflammation chez les hommes alors qu'elle est associée à des changements de facteurs cardio-vasculaires chez les femmes mettant en évidence le besoin évident de recherche sur les conséquences de l'exposome spatial chez les femmes. A l'avenir, il serait intéressant d'approfondir notre compréhension des causes des variations de ces ratios et de déterminer des seuils de NLR, GLR et PLR applicables aux astronautes.

En conclusion, ces études ont montré que le stress microgravitaire, ainsi que des stress physiques et socio-environnementaux similaires à ceux rencontrés en vol impactent le répertoire d'Ac ainsi que la recombinaison V(D)J, contribuant probablement aux changements immunitaires observés chez les



astronautes (Buchheim et al., 2020; Crucian et al., 2018). De plus, les biomarqueurs NLR, GLR et PLR semblent d'un grand intérêt dans le domaine spatial afin de suivre le statut de santé de manière facile et peu onéreuse.

A l'avenir il serait intéressant d'étudier le répertoire d'Ac des volontaires sains impliqués dans le projet BRACE (Bed Rest with Artificial gravity and Cycling Exercise) de l'ESA consistant en un HDTBR avec gravité artificielle et exercices physiques (vélo) pour savoir si ces contremesures sont capables de protéger le répertoire d'Ac des effets de la microgravité simulée. Il serait aussi pertinent d'étudier l'évolution des ratios NLR, GLR et PLR chez ces sujets dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité de ces contremesures. Le laboratoire étant partenaire de ce projet, ces études pourront être réalisées. Il serait aussi intéressant d'analyser l'impact d'une DI de 21 jours sur le répertoire d'Ac car il a été montré que 21 jours de DI induisent un changement du transcriptome des LT (Gallardo-Dodd et al., 2023) et de comparer les résultats obtenus à ceux issus du projet BRACE et ceux présentés dans cette thèse pour les individus soumis à des environnements extrêmes terrestres afin de discriminer l'impact des différents types de stress. L'inauguration de LUNA le 25 septembre 2024, une installation conçue pour recréer la surface lunaire au Centre d'Entraînement des Astronautes de Cologne, offre un nouveau modèle dont il serait intéressant d'étudier l'impact sur l'immunité tout comme le modèle Mars520 utilisé pour mimer un aller-retour jusque Mars. En effet, il a été montré que ce dernier modèle induit une inflammation et une augmentation du nombre de LB (Yi et al., 2014). Enfin, nous avons étudié le répertoire BCR sur plusieurs modèles ainsi que la recombinaison V(D)J, or cette recombinaison n'est pas spécifique aux LB, elle est aussi utilisée par les LT afin de créer leur répertoire de TCR. Aussi, il serait intéressant d'étudier le répertoire TCR afin de savoir s'il est aussi affecté.

Les résultats issus de ces travaux permettront de mieux comprendre les conséquences des vols spatiaux sur l'immunité spécifique et contribueront au développement de contremesures pharmacologiques ou nutritionnelles permettant de préserver le SI des astronautes.

Le travail sur les modèles de stress chroniques présente également un intérêt sociétal. En effet, l'exposition aux stress chroniques est un facteur de risque aggravant pour de nombreuses pathologies et ces stress sont de plus en plus présents dans notre société (Godbout and Glaser, 2006). Les modèles comme Neumayer III ou Concordia sont d'excellents modèles pour exacerber les effets des stress chroniques permettant une compréhension des conséquences directes sur le répertoire d'Ac d'individus représentatifs de notre société (alors que les astronautes sont des individus hyper entraînés et sélectionnés). Le modèle HU est également un modèle intéressant pour améliorer notre compréhension de la relation entre remodelage osseux et lymphopoïèse B, à la fois dans le contexte des vols spatiaux et du vieillissement normal ce qui pourrait conduire à des contremesures pour améliorer l'immunité des astronautes mais aussi des personnes âgées et alitées.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akkaya, M., Kwak, K., Pierce, S.K., 2020. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol* 20, 229–238. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0244-2>
- Alfrey, C.P., Udden, M.M., Huntoon, C.L., Driscoll, T., 1996. Destruction of newly released red blood cells in space flight. *Med Sci Sports Exerc* 28, S42–44. <https://doi.org/10.1097/00005768-199610000-00032>
- Allman, D., Pillai, S., 2008. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.014>
- Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., Becker, J.C., 2006. Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 32–41. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001>
- Arango Duque, G., Descoteaux, A., 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5, 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- Barger, L.K., Flynn-Evans, E.E., Kubey, A., Walsh, L., Ronda, J.M., Wang, W., Wright, K.P., Czeisler, C.A., 2014. Prevalence of sleep deficiency and use of hypnotic drugs in astronauts before, during, and after spaceflight: an observational study. *Lancet Neurol* 13, 904–912. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70122-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70122-X)
- Bascope, M., Guéguinou, N., Schaerlinger, B., Gauquelin-Koch, G., Fripiat, J.-P., 2011. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J* 25, 2947–2955. <https://doi.org/10.1096/fj.11-185215>
- Bascope, M., Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Tschirhart, E., Fripiat, J.-P., 2009. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J* 23, 1607–1615. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121327>
- Bassing, C.H., Swat, W., Alt, F.W., 2002. The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination. *Cell* 109, S45–S55. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00675-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00675-X)
- Bauer, M.E., Jeckel, C.M.M., Luz, C., 2009. The Role of Stress Factors during Aging of the Immune System. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1153, 139–152. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03966.x>
- Beilinson, H.A., Glynn, R.A., Yadavalli, A.D., Xiao, J., Corbett, E., Saribasak, H., Arya, R., Miot, C., Bhattacharyya, A., Jones, J.M., Pongubala, J.M.R., Bassing, C.H., Schatz, D.G., 2021. The RAG1 N-terminal region regulates the efficiency and pathways of synapsis for V(D)J recombination. *J Exp Med* 218, e20210250. <https://doi.org/10.1084/jem.20210250>
- Benjamin, C.L., Stowe, R.P., St John, L., Sams, C.F., Mehta, S.K., Crucian, B.E., Pierson, D.L., Komanduri, K.V., 2016. Decreases in thymopoiesis of astronauts returning from space flight. *JCI Insight* 1, e88787. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88787>
- Bernard, C., Dagonnet, F., 2008. *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*, Champs. Flammarion, Paris.
- Bettridge, J., Na, C.H., Pandey, A., Desiderio, S., 2017. H3K4me3 induces allosteric conformational changes in the DNA-binding and catalytic regions of the V(D)J recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 1904–1909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615727114>
- Bigley, A.B., Agha, N.H., Baker, F.L., Spielmann, G., Kunz, H.E., Mylabathula, P.L., Rooney, B.V., Laughlin, M.S., Mehta, S.K., Pierson, D.L., Crucian, B.E., Simpson, R.J., 2019. NK cell function is impaired during long-duration spaceflight. *J Appl Physiol* (1985) 126, 842–853. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00761.2018>
- Bolland, D.J., Koohy, H., Wood, A.L., Matheson, L.S., Krueger, F., Stubbington, M.J.T., Baizan-Edge, A., Chovanec, P., Stubbs, B.A., Tabbada, K., Andrews, S.R., Spivakov, M., Corcoran, A.E., 2016. Two Mutually Exclusive Local Chromatin States Drive Efficient V(D)J Recombination. *Cell Rep* 15, 2475–2487. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.020>
- Boller, S., Grosschedl, R., 2014. The regulatory network of B-cell differentiation: a focused view of early B-cell factor 1 function. *Immunological Reviews* 261, 102–115. <https://doi.org/10.1111/imr.12206>
- Boller, S., Li, R., Grosschedl, R., 2018. Defining B Cell Chromatin: Lessons from EBF1. *Trends in Genetics* 34, 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.014>



- Bonilla, F.A., Oettgen, H.C., 2010. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Bonneau, R., 1991. Stress-induced suppression of herpes simplex virus (HSV)-specific cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell activity and enhancement of acute pathogenesis following local HSV infection. *Brain, Behavior, and Immunity* 5, 170–192. [https://doi.org/10.1016/0889-1591\(91\)90015-3](https://doi.org/10.1016/0889-1591(91)90015-3)
- Bonnefoy, J., Baselet, B., Moser, D., Ghislin, S., Miranda, S., Riant, E., Vermeesen, R., Keiler, A.M., Baatout, S., Choukér, A., Fripiat, J.-P., 2022. B-Cell Homeostasis Is Maintained During Two Months of Head-Down Tilt Bed Rest With or Without Antioxidant Supplementation. *Front. Immunol.* 13, 830662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.830662>
- Bossen, C., Mansson, R., Murre, C., 2012. Chromatin topology and the regulation of antigen receptor assembly. *Annu Rev Immunol* 30, 337–356. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075003>
- 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* (1985) 98, 905–910. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00957.2004>
- Bradl, H., Wittmann, J., Milius, D., Vettermann, C., Jäck, H.-M., 2003. Interaction of Murine Precursor B Cell Receptor with Stroma Cells Is Controlled by the Unique Tail of  $\lambda 5$  and Stroma Cell-Associated Heparan Sulfate. *The Journal of Immunology* 171, 2338–2348. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2338>
- Brosschot, J.F., Benschop, R.J., Godaert, G.L., Olf, M., De Smet, M., Heijnen, C.J., Ballieux, R.E., 1994. Influence of life stress on immunological reactivity to mild psychological stress. *Psychosom Med* 56, 216–224. <https://doi.org/10.1097/00006842-199405000-00007>
- Buchheim, J.-I., Ghislin, S., Ouzren, N., Albuissou, E., Vanet, A., Matzel, S., Ponomarev, S., Rykova, M., Choukér, A., Fripiat, J.-P., 2020. Plasticity of the human IgM repertoire in response to long-term spaceflight. *FASEB J* 34, 16144–16162. <https://doi.org/10.1096/fj.202001403RR>
- Buchheim, J.-I., Matzel, S., Rykova, M., Vassilieva, G., Ponomarev, S., Nichiporuk, I., Hörll, M., Moser, D., Biere, K., Feuerecker, M., Schelling, G., Thieme, D., Kaufmann, I., Thiel, M., Choukèr, A., 2019. Stress Related Shift Toward Inflammaging in Cosmonauts After Long-Duration Space Flight. *Front. Physiol.* 10, 85. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00085>
- Buravkova, L.B., Rykova, M.P., Grigorieva, V., Antropova, E.N., 2004. Cell interactions in microgravity: cytotoxic effects of natural killer cells in vitro. *J Gravit Physiol* 11, P177-180.
- Burrows, N., Bashford-Rogers, R.J.M., Bhute, V.J., Peñalver, A., Ferdinand, J.R., Stewart, B.J., Smith, J.E.G., Deobagkar-Lele, M., Giudice, G., Connor, T.M., Inaba, A., Bergamaschi, L., Smith, S., Tran, M.G.B., Petsalaki, E., Lyons, P.A., Espeli, M., Huntly, B.J.P., Smith, K.G.C., Cornall, R.J., Clatworthy, M.R., Maxwell, P.H., 2020. Dynamic regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activity is essential for normal B cell development. *Nat Immunol* 21, 1408–1420. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0772-8>
- Cahill, S.P., Pontoski, K., D’Olio, C.M., 2005. Posttraumatic Stress Disorder and Acute Stress Disorder II: Considerations for Treatment and Prevention. *Psychiatry (Edgmont)* 2, 34–46.
- Calcagno, G., Ouzren, N., Kaminski, S., Ghislin, S., Fripiat, J.-P., 2022. Chronic Hypergravity Induces a Modification of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation at TCR $\beta$  Locus in Murine Thymocytes. *Int J Mol Sci* 23, 7133. <https://doi.org/10.3390/ijms23137133>
- Campisi, M., Cannella, L., Pavanello, S., 2024. Cosmic chronometers: Is spaceflight a catalyst for biological ageing? *Ageing Research Reviews* 95, 102227. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102227>
- Campos Costa, I., Nogueira Carvalho, H., Fernandes, L., 2013. Aging, circadian rhythms and depressive disorders: a review. *Am J Neurodegener Dis* 2, 228–246.
- Cannon, 1934. The Wisdom of the Body. *Nature* 133, 82–82. <https://doi.org/10.1038/133082a0>
- Capri, M., Conte, M., Ciarca, E., Pirazzini, C., Garagnani, P., Santoro, A., Longo, F., Salvioli, S., Lau, P., Moeller, R., Jordan, J., Illig, T., Villanueva, M.-M., Gruber, M., Bürkle, A., Franceschi, C., Rittweger, J., 2023. Long-term human spaceflight and inflammaging: Does it promote aging? *Ageing Research Reviews* 87, 101909. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101909>
- Carmona, L.M., Schatz, D.G., 2017. New insights into the evolutionary origins of the recombination-activating gene proteins and V(D)J recombination. *FEBS J* 284, 1590–1605. <https://doi.org/10.1111/febs.13990>



- Chang, D.G., Healey, R.M., Snyder, A.J., Sayson, J.V., Macias, B.R., Coughlin, D.G., Bailey, J.F., Parzynski, S.E., Lotz, J.C., Hargens, A.R., 2016. Lumbar Spine Paraspinal Muscle and Intervertebral Disc Height Changes in Astronauts After Long-Duration Spaceflight on the International Space Station. *Spine (Phila Pa 1976)* 41, 1917–1924. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000001873>
- Chang, H.H.Y., Lieber, M.R., 2016. Structure-Specific nuclease activities of Artemis and the Artemis: DNA-PKcs complex. *Nucleic Acids Res* 44, 4991–4997. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw456>
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., Lieber, M.R., 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Chang, T.T., Walther, I., Li, C.-F., Boonyaratanakornkit, J., Galleri, G., Meloni, M.A., Pippia, P., Cogoli, A., Hughes-Fulford, M., 2012. The Rel/NF- $\kappa$ B pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity. *J Leukoc Biol* 92, 1133–1145. <https://doi.org/10.1189/jlb.0312157>
- Chaplin, D.D., 2010. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chapman, K., Holmes, M., Seckl, J., 2013. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiological Reviews* 93, 1139–1206. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012>
- Chen, Y., Lyga, J., 2014. Brain-skin connection: stress, inflammation and skin aging. *Inflamm Allergy Drug Targets* 13, 177–190. <https://doi.org/10.2174/1871528113666140522104422>
- Chi, X., Li, Y., Qiu, X., 2020. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology* 160, 233–247. <https://doi.org/10.1111/imm.13176>
- Choi, N.M., Loguercio, S., Verma-Gaur, J., Degner, S.C., Torkamani, A., Su, A.I., Oltz, E.M., Artyomov, M., Feeney, A.J., 2013. Deep sequencing of the murine IgH repertoire reveals complex regulation of nonrandom V gene rearrangement frequencies. *J Immunol* 191, 2393–2402. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301279>
- Choukér, A., Stahn, A.C., 2020. COVID-19—The largest isolation study in history: the value of shared learnings from spaceflight analogs. *npj Microgravity* 6, 32. <https://doi.org/10.1038/s41526-020-00122-8>
- Chtanova, T., Tangye, S.G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M.R., Rolph, M.S., Mackay, C.R., 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol* 173, 68–78. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.1.68>
- Chung, J.B., Silverman, M., Monroe, J.G., 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol* 24, 343–349. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(03\)00119-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00119-4)
- Ciobotaru, M., Surleac, M.D., Metskas, L.A., Koo, P., Rhoades, E., Petrescu, A.J., Schatz, D.G., 2015. The architecture of the 12RSS in V(D)J recombination signal and synaptic complexes. *Nucleic Acids Research* 43, 917–931. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1348>
- Clark, M.R., Mandal, M., Ochiai, K., Singh, H., 2014. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 14, 69–80. <https://doi.org/10.1038/nri3570>
- Clément, G., Skinner, A., Lathan, C., 2013. Distance and Size Perception in Astronauts during Long-Duration Spaceflight. *Life (Basel)* 3, 524–537. <https://doi.org/10.3390/life3040524>
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., Busslinger, M., 2007. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 8, 463–470. <https://doi.org/10.1038/ni1454>
- Cooper, M.D., Alder, M.N., 2006. The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell* 124, 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001>
- Corbett, B., Weinberg, L., Duarte, A., 2017. The effect of mild acute stress during memory consolidation on emotional recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 145, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.08.005>
- Corcoran, A.E., 2005. Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol* 17, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.01.002>
- Corfe, S.A., Paige, C.J., 2012. The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Semin Immunol* 24, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.02.001>



- Corthay, A., 2009. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70, 326–336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x>
- Corydon, T.J., Kopp, S., Wehland, M., Braun, M., Schütte, A., Mayer, T., Hülsing, T., Oltmann, H., Schmitz, B., Hemmersbach, R., Grimm, D., 2016. Alterations of the cytoskeleton in human cells in space proved by life-cell imaging. *Sci Rep* 6, 20043. <https://doi.org/10.1038/srep20043>
- Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., Avrameas, S., 1995. Natural autoantibodies. *Current Opinion in Immunology* 7, 812–818. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80053-0](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80053-0)
- Crucian, B., Babiak-Vazquez, A., Johnston, S., Pierson, D.L., Ott, C.M., Sams, C., 2016. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *Int J Gen Med* 9, 383–391. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S114188>
- Crucian, B., Simpson, R.J., Mehta, S., Stowe, R., Chouker, A., Hwang, S.-A., Actor, J.K., Salam, A.P., Pierson, D., Sams, C., 2014. Terrestrial stress analogs for spaceflight associated immune system dysregulation. *Brain, Behavior, and Immunity* 39, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.01.011>
- Crucian, B., Stowe, R., Quiariarte, H., Pierson, D., Sams, C., 2011. Monocyte phenotype and cytokine production profiles are dysregulated by short-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med* 82, 857–862. <https://doi.org/10.3357/ASEM.3047.2011>
- Crucian, B.E., Choukèr, A., Simpson, R.J., Mehta, S., Marshall, G., Smith, S.M., Zwart, S.R., Heer, M., Ponomarev, S., Whitmire, A., Frippiat, J.P., Douglas, G.L., Lorenzi, H., Buchheim, J.-I., Makedonas, G., Ginsburg, G.S., Ott, C.M., Pierson, D.L., Krieger, S.S., Baecker, N., Sams, C., 2018. Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions. *Front Immunol* 9, 1437. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01437>
- Crucian, B.E., Stowe, R.P., Pierson, D.L., Sams, C.F., 2008. Immune System Dysregulation Following Short- vs Long-Duration Spaceflight. *aviat space environ med* 79, 835–843. <https://doi.org/10.3357/ASEM.2276.2008>
- Cucinotta, F.A., Durante, M., 2006. Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings. *Lancet Oncol* 7, 431–435. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70695-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70695-7)
- Cyster, J.G., Hartley, S.B., Goodnow, C.C., 1994. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 371, 389–395. <https://doi.org/10.1038/371389a0>
- Dahl, M., Kristensen, L.S., Grønbaek, K., 2018. Long Non-Coding RNAs Guide the Fine-Tuning of Gene Regulation in B-Cell Development and Malignancy. *Int J Mol Sci* 19, 2475. <https://doi.org/10.3390/ijms19092475>
- Dai, S., Mo, Y., Wang, Y., Xiang, B., Liao, Q., Zhou, M., Li, X., Li, Y., Xiong, W., Li, G., Guo, C., Zeng, Z., 2020. Chronic Stress Promotes Cancer Development. *Front Oncol* 10, 1492. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01492>
- Dalal, I., Tasher, 2012. The genetic basis of severe combined immunodeficiency and its variants. *TACG* 67. <https://doi.org/10.2147/TACG.S18693>
- De Abreu, S., Amirova, L., Murphy, R., Wallace, R., Twomey, L., Gauquelin-Koch, G., Raverot, V., Larcher, F., Custaud, M.-A., Navasiolava, N., 2017. Multi-System Deconditioning in 3-Day Dry Immersion without Daily Raise. *Front Physiol* 8, 799. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00799>
- De Ioannes, P., Malu, S., Cortes, P., Aggarwal, A.K., 2012. Structural basis of DNA ligase IV-Artemis interaction in nonhomologous end-joining. *Cell Rep* 2, 1505–1512. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.004>
- De Kloet, E.R., Joëls, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463–475. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joëls, M., 1998. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease\*. *Endocrine Reviews* 19, 269–301. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0331>
- De Punder, K., Heim, C., Wadhwa, P.D., Entringer, S., 2019. Stress and immunosenescence: The role of telomerase. *Psychoneuroendocrinology* 101, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.10.019>
- Deak, T., Nguyen, K.T., Fleshner, M., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1999. Acute stress may facilitate recovery from a subcutaneous bacterial challenge. *Neuroimmunomodulation* 6, 344–354. <https://doi.org/10.1159/000026394>



- DeKoter, R.P., Singh, H., 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439–1441. <https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1439>
- Demirdal, T., Sen, P., 2018. The significance of neutrophil-lymphocyte ratio, platelet-lymphocyte ratio and lymphocyte-monocyte ratio in predicting peripheral arterial disease, peripheral neuropathy, osteomyelitis and amputation in diabetic foot infection. *Diabetes Res Clin Pract* 144, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.08.009>
- Deng, S.K., Gibb, B., de Almeida, M.J., Greene, E.C., Symington, L.S., 2014. RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 21, 405–412. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2786>
- Dhabhar, F.S., 2002. Stress-induced augmentation of immune function--the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behav Immun* 16, 785–798. [https://doi.org/10.1016/s0889-1591\(02\)00036-3](https://doi.org/10.1016/s0889-1591(02)00036-3)
- Dhabhar, F.S., Malarkey, W.B., Neri, E., McEwen, B.S., 2012. Stress-induced redistribution of immune cells—From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones – Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1345–1368. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.05.008>
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 2007. Bi-directional Effects of Stress on Immune Function: Possible Explanations for Salubrious as Well as Harmful Effects, in: *Psychoneuroimmunology*. Elsevier, pp. 723–760. <https://doi.org/10.1016/B978-012088576-3/50041-1>
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1059–1064. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.1059>
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1997. Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* 65, 360–368. <https://doi.org/10.1159/000127196>
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J Immunol* 157, 1638–1644.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1995. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol* 154, 5511–5527.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., Stein, M., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1994. Diurnal and Acute Stress-Induced Changes in Distribution of Peripheral Blood Leukocyte Subpopulations. *Brain, Behavior, and Immunity* 8, 66–79. <https://doi.org/10.1006/brbi.1994.1006>
- Dhabhar, F.S., Viswanathan, K., 2005. Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289, R738–R744. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00145.2005>
- Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., Morrison, S.J., 2012. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457–462. <https://doi.org/10.1038/nature10783>
- Dragoş, D., Tănăsescu, M.D., 2010. The effect of stress on the defense systems. *J Med Life* 3, 10–18.
- Dunn, C., Boyd, M., Orengo, I., 2018. Dermatologic manifestations in spaceflight: a review. *Dermatol Online J* 24, 13030/qt9dw087tt.
- Durante, M., Cucinotta, F.A., 2008. Heavy ion carcinogenesis and human space exploration. *Nat Rev Cancer* 8, 465–472. <https://doi.org/10.1038/nrc2391>
- Ebert, A., Hill, L., Busslinger, M., 2015. Spatial Regulation of V-(D)J Recombination at Antigen Receptor Loci. *Adv Immunol* 128, 93–121. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.07.006>
- Edwards, K.M., Burns, V.E., Adkins, A.E., Carroll, D., Drayson, M., Ring, C., 2008. Meningococcal A vaccination response is enhanced by acute stress in men. *Psychosom Med* 70, 147–151. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e318164232e>
- Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.-K., Rizzi, M., 2014. B cell biology: an overview. *Curr Allergy Asthma Rep* 14, 434. <https://doi.org/10.1007/s11882-014-0434-8>
- Elantak, L., Espeli, M., Boned, A., Bornet, O., Bonzi, J., Gauthier, L., Feracci, M., Roche, P., Guerlesquin, F., Schiff, C., 2012. Structural Basis for Galectin-1-dependent Pre-B Cell Receptor (Pre-BCR) Activation. *Journal of Biological Chemistry* 287, 44703–44713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395152>
- Elenkov, I.J., 2004. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci* 1024, 138–146. <https://doi.org/10.1196/annals.1321.010>



- Espeli, M., Mancini, S.J.C., Breton, C., Poirier, F., Schiff, C., 2009. Impaired B-cell development at the pre-BII-cell stage in galectin-1-deficient mice due to inefficient pre-BII/stromal cell interactions. *Blood* 113, 5878–5886. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-198465>
- Fagiani, F., Di Marino, D., Romagnoli, A., Travelli, C., Voltan, D., Di Cesare Mannelli, L., Racchi, M., Govoni, S., Lanni, C., 2022. Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 7, 41. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00899-y>
- Ferstl, R., 2012. Histamine regulation of innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 17, 40. <https://doi.org/10.2741/3914>
- Feuerecker, M., Crucian, B.E., Quintens, R., Buchheim, J., Salam, A.P., Rybka, A., Moreels, M., Strewe, C., Stowe, R., Mehta, S., Schelling, G., Thiel, M., Baatout, S., Sams, C., Choukèr, A., 2019. Immune sensitization during 1 year in the Antarctic high-altitude Concordia Environment. *Allergy* 74, 64–77. <https://doi.org/10.1111/all.13545>
- Feuerecker, M., Strewe, C., Aumayr, M., Heitland, T., Limper, U., Crucian, B., Baatout, S., Choukèr, A., 2022. One Year in the Extreme Isolation of Antarctica—Is This Enough to Modulate an “Allergic” Sensitization? *Biomedicines* 10, 448. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020448>
- Fonte, C., Kaminski, S., Vanet, A., Lanfumey, L., Cohen-Salmon, C., Ghislin, S., Fripiat, J.-P., 2019. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR- $\beta$  repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB j.* 33, 896–908. <https://doi.org/10.1096/fj.201800969R>
- Frank, M.G., Baratta, M.V., Sprunger, D.B., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2007. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain, Behavior, and Immunity* 21, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.03.005>
- Fripiat, J.-P., 2013. Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. *Mol Immunol* 56, 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.06.011>
- Fu, H., Qin, B., Hu, Z., Ma, N., Yang, M., Wei, T., Tang, Q., Huang, Y., Huang, F., Liang, Y., Yang, Z., Zhong, R., 2015. Neutrophil- and platelet-to-lymphocyte ratios are correlated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Lab* 61, 269–273. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2014.140927>
- Fulcher, D.A., Basten, A., 1994. Reduced life span of anergic self-reactive B cells in a double-transgenic model. *J Exp Med* 179, 125–134. <https://doi.org/10.1084/jem.179.1.125>
- Füllgrabe, J., Hajji, N., Joseph, B., 2010. Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. *Cell Death Differ* 17, 1238–1243. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.58>
- Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., Buslinger, M., 2004. Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev* 18, 411–422. <https://doi.org/10.1101/gad.291504>
- Gaignier, F., Schenten, V., De Carvalho Bittencourt, M., Gauquelin-Koch, G., Fripiat, J.-P., Legrand-Frossi, C., 2014. Three weeks of murine hindlimb unloading induces shifts from B to T and from th to tc splenic lymphocytes in absence of stress and differentially reduces cell-specific mitogenic responses. *PLoS One* 9, e92664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092664>
- Gallardo-Dodd, C.J., Oertlin, C., Record, J., Galvani, R.G., Sommerauer, C., Kuznetsov, N.V., Doukoumopoulos, E., Ali, L., Oliveira, M.M.S., Seitz, C., Percipalle, M., Nikić, T., Sadova, A.A., Shulgina, S.M., Shmarov, V.A., Kutko, O.V., Vlasova, D.D., Orlova, K.D., Rykova, M.P., Andersson, J., Percipalle, P., Kutter, C., Ponomarev, S.A., Westerberg, L.S., 2023. Exposure of volunteers to microgravity by dry immersion bed over 21 days results in gene expression changes and adaptation of T cells. *Sci. Adv.* 9, eadg1610. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg1610>
- Gambacurta, A., Merlini, G., Ruggiero, C., Diedenhofen, G., Battista, N., Bari, M., Balsamo, M., Piccirillo, S., Valentini, G., Mascetti, G., Maccarrone, M., 2019. Human osteogenic differentiation in Space: proteomic and epigenetic clues to better understand osteoporosis. *Sci Rep* 9, 8343. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44593-6>
- Gao, M., Dong, C., Chen, Z., Jiang, R., Shaw, P., Gao, W., Sun, Y., 2024. Different impact of short-term and long-term hindlimb disuse on bone homeostasis. *Gene* 918, 148457. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148457>



- Garrett-Bakelman, F.E., Darshi, M., Green, S.J., Gur, R.C., Lin, L., Macias, B.R., McKenna, M.J., Meydan, C., Mishra, T., Nasrini, J., Piening, B.D., Rizzardi, L.F., Sharma, K., Siamwala, J.H., Taylor, L., Vitaterna, M.H., Afkarian, M., Afshinnekoo, E., Ahadi, S., Ambati, A., Arya, M., Bezdán, D., Callahan, C.M., Chen, S., Choi, A.M.K., Chlipala, G.E., Contrepois, K., Covington, M., Crucian, B.E., De Vivo, I., Dinges, D.F., Ebert, D.J., Feinberg, J.I., Gandara, J.A., George, K.A., Goutsias, J., Grills, G.S., Hargens, A.R., Heer, M., Hillary, R.P., Hoofnagle, A.N., Hook, V.Y.H., Jenkinson, G., Jiang, P., Keshavarzian, A., Laurie, S.S., Lee-McMullen, B., Lumpkins, S.B., MacKay, M., Maienschein-Cline, M.G., Melnick, A.M., Moore, T.M., Nakahira, K., Patel, H.H., Pietrzyk, R., Rao, V., Saito, R., Salins, D.N., Schilling, J.M., Sears, D.D., Sheridan, C.K., Stenger, M.B., Tryggvadottir, R., Urban, A.E., Vaisar, T., Van Espen, B., Zhang, J., Ziegler, M.G., Zwart, S.R., Charles, J.B., Kundrot, C.E., Scott, G.B.I., Bailey, S.M., Basner, M., Feinberg, A.P., Lee, S.M.C., Mason, C.E., Mignot, E., Rana, B.K., Smith, S.M., Snyder, M.P., Turek, F.W., 2019. The NASA Twins Study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight. *Science* 364, eaau8650. <https://doi.org/10.1126/science.aau8650>
- Garvy, B.A., King, L.E., Telford, W.G., Morford, L.A., Fraker, P.J., 1993a. Chronic elevation of plasma corticosterone causes reductions in the number of cycling cells of the B lineage in murine bone marrow and induces apoptosis. *Immunology* 80, 587–592.
- Garvy, B.A., Telford, W.G., King, L.E., Fraker, P.J., 1993b. Glucocorticoids and irradiation-induced apoptosis in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry. *Immunology* 79, 270–277.
- Gazumyan, A., Reichlin, A., Nussenzweig, M.C., 2006. Ig $\beta$  tyrosine residues contribute to the control of B cell receptor signaling by regulating receptor internalization. *J Exp Med* 203, 1785–1794. <https://doi.org/10.1084/jem.20060221>
- Geisberger, R., Lamers, M., Achatz, G., 2006. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* 118, 429–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02386.x>
- Gerbaix, M., Gnyubkin, V., Farlay, D., Olivier, C., Ammann, P., Courbon, G., Laroche, N., Genthial, R., Follet, H., Peyrin, F., Shenkman, B., Gauquelin-Koch, G., Vico, L., 2017. One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons. *Sci Rep* 7, 2659. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03014-2>
- Ghislin, S., Ouzren-Zarhloul, N., Kaminski, S., Fripiat, J.-P., 2015. Hypergravity exposure during gestation modifies the TCR $\beta$  repertoire of newborn mice. *Sci Rep* 5, 9318. <https://doi.org/10.1038/srep09318>
- Glaser, R., Sheridan, J., Malarkey, W.B., MacCallum, R.C., Kiecolt-Glaser, J.K., 2000. Chronic stress modulates the immune response to a pneumococcal pneumonia vaccine. *Psychosom Med* 62, 804–807. <https://doi.org/10.1097/00006842-200011000-00010>
- Godbout, J.P., Glaser, R., 2006. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J Neuroimmune Pharmacol* 1, 421–427. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9036-0>
- Godoy, L.D., Rossignoli, M.T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N., de Lima Umeoka, E.H., 2018. A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Front Behav Neurosci* 12, 127. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00127>
- Goldstein, D.S., 1987. Stress-induced activation of the sympathetic nervous system. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1, 253–278. [https://doi.org/10.1016/s0950-351x\(87\)80063-0](https://doi.org/10.1016/s0950-351x(87)80063-0)
- Gong, M., Li, X., Zheng, A., Xu, H., Xie, S., Yan, R., Wu, H., Wang, Z., 2021. Age-related changes in the TRB and IGH repertoires in healthy adult males and females. *Immunol Lett* 240, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.10.002>
- Griffin, D.O., Holodick, N.E., Rothstein, T.L., 2011. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-. *Journal of Experimental Medicine* 208, 67–80. <https://doi.org/10.1084/jem.20101499>
- Grundy, G.J., Ramón-Maiques, S., Dimitriadis, E.K., Kotova, S., Biertümpfel, C., Heymann, J.B., Steven, A.C., Gellert, M., Yang, W., 2009. Initial stages of V(D)J recombination: the organization of RAG1/2 and RSS DNA in the postcleavage complex. *Mol Cell* 35, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.022>



- Guéguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J.-L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C., Fripiat, J.-P., 2009. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J Leukoc Biol* 86, 1027–1038. <https://doi.org/10.1189/jlb.0309167>
- Gwin, K.A., Shapiro, M.B., Dolence, J.J., Huang, Z.L., Medina, K.L., 2013. Hoxa9 and Flt3 Signaling Synergistically Regulate an Early Checkpoint in Lymphopoiesis. *The Journal of Immunology* 191, 745–754. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203294>
- Hardy, R.R., Hayakawa, K., 2015. Perspectives on fetal derived CD5<sup>+</sup> B1 B cells. *Eur J Immunol* 45, 2978–2984. <https://doi.org/10.1002/eji.201445146>
- Hargens, A.R., Vico, L., 2016. Long-duration bed rest as an analog to microgravity. *Journal of Applied Physiology* 120, 891–903. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00935.2015>
- Harris, L.R., Jenkin, M., Jenkin, H., Zacher, J.E., Dyde, R.T., 2017. The effect of long-term exposure to microgravity on the perception of upright. *NPJ Microgravity* 3, 3. <https://doi.org/10.1038/s41526-016-0005-5>
- Hartley, S.B., Cooke, M.P., Fulcher, D.A., Harris, A.W., Cory, S., Basten, A., Goodnow, C.C., 1993. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72, 325–335. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90111-3)
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R., Herzenberg, L.A., 1983. The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *The Journal of experimental medicine* 157, 202–218. <https://doi.org/10.1084/jem.157.1.202>
- He, Z., Ma, J., Wang, R., Zhang, J., Huang, Z., Wang, F., Sen, S., Rothenberg, E.V., Sun, Z., 2017. A two-amino-acid substitution in the transcription factor ROR $\gamma$ t disrupts its function in TH17 differentiation but not in thymocyte development. *Nat Immunol* 18, 1128–1138. <https://doi.org/10.1038/ni.3832>
- Heizmann, B., Kastner, P., Chan, S., 2018. The Ikaros family in lymphocyte development. *Current Opinion in Immunology* 51, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.11.005>
- Henikoff, S., 2008. Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet* 9, 15–26. <https://doi.org/10.1038/nrg2206>
- Herzog, S., Reth, M., Jumaa, H., 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 9, 195–205. <https://doi.org/10.1038/nri2491>
- Hesslein, D.G.T., Pflugh, D.L., Chowdhury, D., Bothwell, A.L.M., Sen, R., Schatz, D.G., 2003. Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes Dev* 17, 37–42. <https://doi.org/10.1101/gad.1031403>
- Holwerda, S.J.B., van de Werken, H.J.G., Ribeiro de Almeida, C., Bergen, I.M., de Bruijn, M.J.W., Verstegen, M.J.A.M., Simonis, M., Splinter, E., Wijchers, P.J., Hendriks, R.W., de Laat, W., 2013. Allelic exclusion of the immunoglobulin heavy chain locus is independent of its nuclear localization in mature B cells. *Nucleic Acids Res* 41, 6905–6916. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt491>
- Hong, B., Wu, Y., Li, W., Wang, X., Wen, Y., Jiang, S., Dimitrov, D.S., Ying, T., 2018. In-Depth Analysis of Human Neonatal and Adult IgM Antibody Repertoires. *Front. Immunol.* 9, 128. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00128>
- Hou, P., Araujo, E., Zhao, T., Zhang, M., Massenburg, D., Veselits, M., Doyle, C., Dinner, A.R., Clark, M.R., 2006. B Cell Antigen Receptor Signaling and Internalization Are Mutually Exclusive Events. *PLoS Biol* 4, e200. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040200>
- Hughes-Fulford, M., 2003. Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. *Adv Space Res* 32, 1585–1593. [https://doi.org/10.1016/S0273-1177\(03\)90399-1](https://doi.org/10.1016/S0273-1177(03)90399-1)
- Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Schenten, V., Bascove, M., Koch, G.G., Baatout, S., Tschirhart, E., Fripiat, J.-P., 2013. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB J* 27, 333–341. <https://doi.org/10.1096/fj.12-217547>
- Hwang, J.K., Alt, F.W., Yeap, L.-S., 2015. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol Spectr* 3, MDNA3-0037–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0037-2014>
- Ichiki, A.T., Gibson, L.A., Jago, T.L., Strickland, K.M., Johnson, D.L., Lange, R.D., Allebban, Z., 1996. Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J Leukoc Biol* 60, 37–43. <https://doi.org/10.1002/jlb.60.1.37>



- Iosim, S., MacKay, M., Westover, C., Mason, C.E., 2019. Translating current biomedical therapies for long duration, deep space missions. *Precis Clin Med* 2, 259–269. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz022>
- Isaac, V., Wu, C.-Y., Huang, C.-T., Baune, B.T., Tseng, C.-L., McLachlan, C.S., 2016. Elevated neutrophil to lymphocyte ratio predicts mortality in medical inpatients with multiple chronic conditions. *Medicine* 95, e3832. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003832>
- Isern, J., Méndez-Ferrer, S., 2011. Stem cell interactions in a bone marrow niche. *Curr Osteoporos Rep* 9, 210–218. <https://doi.org/10.1007/s11914-011-0075-y>
- Jabaaij, L., Grosheide, P.M., Heijtkink, R.A., Duivenvoorden, H.J., Ballieux, R.E., Vingerhoets, A.J., 1993. Influence of perceived psychological stress and distress on antibody response to low dose rDNA hepatitis B vaccine. *J Psychosom Res* 37, 361–369. [https://doi.org/10.1016/0022-3999\(93\)90138-6](https://doi.org/10.1016/0022-3999(93)90138-6)
- Jacob, P., Bonnefoy, J., Ghislin, S., Fripiat, J.-P., 2022. Long-duration head-down tilt bed rest confirms the relevance of the neutrophil to lymphocyte ratio and suggests coupling it with the platelet to lymphocyte ratio to monitor the immune health of astronauts. *Front. Immunol.* 13, 952928. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.952928>
- Jacob, P., Oertlin, C., Baselet, B., Westerberg, L.S., Fripiat, J.-P., Baatout, S., 2023. Next generation of astronauts or ESA astronaut 2.0 concept and spotlight on immunity. *npj Microgravity* 9, 51. <https://doi.org/10.1038/s41526-023-00294-z>
- Jang, T.Y., Heo, M.-J., Jung, A.-Y., Kim, Y.H., 2015. Prolonged Anti-Orthostatic Hind Limb Unloading and Murine Allergic Asthma. *Aerosp Med Hum Perform* 86, 803–807. <https://doi.org/10.3357/AMHP.4265.2015>
- Jeggo, P., O'Neill, P., 2002. The Greek Goddess, Artemis, reveals the secrets of her cleavage. *DNA Repair (Amst)* 1, 771–777. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(02\)00096-4](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(02)00096-4)
- Jiang, H., Chang, F.-C., Ross, A.E., Lee, J., Nakayama, Keiichi, Nakayama, Keiko, Desiderio, S., 2005. Ubiquitylation of RAG-2 by Skp2-SCF links destruction of the V(D)J recombinase to the cell cycle. *Mol Cell* 18, 699–709. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.05.011>
- Kaminski, D.A., Stavnezer, J., 2006. Enhanced IgA Class Switching in Marginal Zone and B1 B Cells Relative to Follicular/B2 B Cells. *The Journal of Immunology* 177, 6025–6029. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6025>
- Kanas, N., Sandal, G., Boyd, J.E., Gushin, V.I., Manzey, D., North, R., Leon, G.R., Suedfeld, P., Bishop, S., Fiedler, E.R., Inoue, N., Johannes, B., Kealey, D.J., Kraft, N., Matsuzaki, I., Musson, D., Palinkas, L.A., Salnitskiy, V.P., Sipes, W., Stuster, J., Wang, J., 2009. Psychology and culture during long-duration space missions. *Acta Astronautica* 64, 659–677. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2008.12.005>
- Kantor, A.B., Stall, A.M., Adams, S., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., 1992. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3320–3324. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3320>
- 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, 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2003.10.005>
- Keszei, M., Westerberg, L.S., 2014. Congenital defects in neutrophil dynamics. *J Immunol Res* 2014, 303782. <https://doi.org/10.1155/2014/303782>
- Kim, M.-S., Lapkouski, M., Yang, W., Gellert, M., 2015. Crystal structure of the V(D)J recombinase RAG1-RAG2. *Nature* 518, 507–511. <https://doi.org/10.1038/nature14174>
- Kimzey, S.L., Johnson, P.C., Ritzman, S.E., Mengel, C.E., 1976. Hematology and immunology studies: the second manned Skylab mission. *Aviat Space Environ Med* 47, 383–390.
- Kinsey, S.G., Prendergast, B.J., Nelson, R.J., 2003. Photoperiod and stress affect wound healing in Siberian hamsters. *Physiol Behav* 78, 205–211. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00967-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00967-8)
- Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P., Chan, S., 2002. Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol* 32, 720–730. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200203\)32:3<720::AID-IMMU720>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200203)32:3<720::AID-IMMU720>3.0.CO;2-P)
- Kleiman, E., Loguercio, S., Feeney, A.J., 2018. Epigenetic Enhancer Marks and Transcription Factor Binding Influence V $\kappa$  Gene Rearrangement in Pre-B Cells and Pro-B Cells. *Front Immunol* 9, 2074. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02074>
- Kondo, M., Weissman, I.L., Akashi, K., 1997. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell* 91, 661–672. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80453-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80453-5)



- Koning, M.T., Vletter, E.M., Rademaker, R., Vergroesen, R.D., Trollmann, I.J.M., Parren, P., Van Bergen, C.A.M., Scherer, H.U., Kiełbasa, S.M., Toes, R.E.M., Veelken, H., 2020. Templated insertions at V(D) and DJ junctions create unique B-cell receptors in the healthy B-cell repertoire. *Eur J Immunol* 50, 2099–2101. <https://doi.org/10.1002/eji.202048828>
- Korzhenovich, J., Janowska, I., Van Der Burg, M., Rizzi, M., 2023. Human and mouse early B cell development: So similar but so different. *Immunology Letters* 261, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2023.07.004>
- Krangel, M.S., 2003. Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat Immunol* 4, 624–630. <https://doi.org/10.1038/ni0703-624>
- Krittanawong, C., Singh, N.K., Scheuring, R.A., Urquieta, E., Bershady, E.M., Macaulay, T.R., Kaplin, S., Dunn, C., Kry, S.F., Russomano, T., Shepanek, M., Stowe, R.P., Kirkpatrick, A.W., Broderick, T.J., Sibonga, J.D., Lee, A.G., Crucian, B.E., 2022. Human Health during Space Travel: State-of-the-Art Review. *Cells* 12, 40. <https://doi.org/10.3390/cells12010040>
- Kumar, B.V., Connors, T.J., Farber, D.L., 2018. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* 48, 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Kumari, G., Sen, R., 2015. Chromatin Interactions in the Control of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Assembly. *Adv Immunol* 128, 41–92. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.08.001>
- Künzli, M., Masopust, D., 2023. CD4+ T cell memory. *Nat Immunol* 24, 903–914. <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01510-4>
- LeBien, T.W., Tedder, T.F., 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570–1580. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>
- LeBlanc, A., Shackelford, L., Schneider, V., 1998. Future human bone research in space. *Bone* 22, 113S–116S. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(98\)00013-1](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(98)00013-1)
- Lee, J., Kuchen, S., Fischer, R., Chang, S., Lipsky, P.E., 2009. Identification and Characterization of a Human CD5+ Pre-Naive B Cell Population. *The Journal of Immunology* 182, 4116–4126. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803391>
- Lenaerts, A., Kucinski, I., Deboutte, W., Derecka, M., Cauchy, P., Manke, T., Göttgens, B., Grosschedl, R., 2022. EBF1 primes B-lymphoid enhancers and limits the myeloid bias in murine multipotent progenitors. *Journal of Experimental Medicine* 219, e20212437. <https://doi.org/10.1084/jem.20212437>
- Lescale, C., Schenten, V., Djeghloul, D., Bennabi, M., Gaignier, F., Vandamme, K., Strazielle, C., Kuzniak, I., Petite, H., Dosquet, C., Fripiat, J., Goodhardt, M., 2015. Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. *FASEB j.* 29, 455–463. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259770>
- Limardo, J.G., Allen, C.S., Danielson, R.W., 2013. Assessment of Crewmember Noise Exposures on the International Space Station, in: 43rd International Conference on Environmental Systems. Presented at the 43rd International Conference on Environmental Systems, American Institute of Aeronautics and Astronautics, Vail, CO. <https://doi.org/10.2514/6.2013-3516>
- Lin, W.C., Desiderio, S., 1994. Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2733–2737. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2733>
- Linossier, M.-T., Peurière, L., Fernandez, P., Normand, M., Beck, A., Bareille, M.-P., Bonneau, C., Gauquelin-Koch, G., Vico, L., 2022. DI-5-Cuffs: Bone Remodelling and Associated Metabolism Markers in Humans After Five Days of Dry Immersion to Simulate Microgravity. *Front Physiol* 13, 801448. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.801448>
- Lopez Granados, E., Porpiglia, A.S., Hogan, M.B., Matamoros, N., Krasovec, S., Pignata, C., Smith, C.I.E., Hammarstrom, L., Bjorkander, J., Belohradsky, B.H., Casariego, G.F., Garcia Rodriguez, M.C., Conley, M.E., 2002. Clinical and molecular analysis of patients with defects in  $\mu$  heavy chain gene. *J. Clin. Invest.* 110, 1029–1035. <https://doi.org/10.1172/JCI0215658>
- Ma, F., Cao, Y., Du, H., Braikia, F.Z., Zong, L., Ollikainen, N., Bayer, M., Qiu, X., Park, B., Roy, R., Nandi, S., Sarantopoulou, D., Ziman, A., Bianchi, A.H., Beerman, I., Zhao, K., Grosschedl, R., Sen, R., 2024. Three-dimensional chromatin reorganization regulates B cell development during ageing. *Nat Cell Biol* 26, 991–1002. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01424-9>



- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., Lieber, M.R., 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781–794. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00671-2)
- Mader, T.H., Gibson, C.R., Pass, A.F., Kramer, L.A., Lee, A.G., Fogarty, J., Tarver, W.J., Dervay, J.P., Hamilton, D.R., Sargsyan, A., Phillips, J.L., Tran, D., Lipsky, W., Choi, J., Stern, C., Kuyumjian, R., Polk, J.D., 2011. Optic disc edema, globe flattening, choroidal folds, and hyperopic shifts observed in astronauts after long-duration space flight. *Ophthalmology* 118, 2058–2069. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.06.021>
- Maezawa, S., Nakano, S., Kuniya, T., Koiwai, O., Koiwai, K., 2016. Double-strand break repair based on short-homology regions is suppressed under terminal deoxynucleotidyltransferase expression, as revealed by a novel vector system for analysing DNA repair by nonhomologous end joining. *FEBS Open Bio* 6, 16–23. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12001>
- Mak, K.S., Funnell, A.P.W., Pearson, R.C.M., Crossley, M., 2011. PU.1 and Haematopoietic Cell Fate: Dosage Matters. *Int J Cell Biol* 2011, 808524. <https://doi.org/10.1155/2011/808524>
- Malu, S., Malshetty, V., Francis, D., Cortes, P., 2012. Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunol Res* 54, 233–246. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8329-z>
- Marshall, A.J., Fleming, H.E., Wu, G.E., Paige, C.J., 1998. Modulation of the IL-7 dose-response threshold during pro-B cell differentiation is dependent on pre-B cell receptor expression. *J Immunol* 161, 6038–6045.
- Mårtensson, I.-L., Almqvist, N., Grimsholm, O., Bernardi, A.I., 2010. The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett* 584, 2572–2579. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.057>
- Martin, F., Kearney, J.F., 2002. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 323–335. <https://doi.org/10.1038/nri799>
- Martin, V., Wu, Y., Kipling, D., Dunn-Walters, D.K., 2015. Age-related aspects of human IgM<sup>+</sup> B cell heterogeneity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1362, 153–163. <https://doi.org/10.1111/nyas.12823>
- Martinez-Agosto, J.A., Mikkola, H.K.A., Hartenstein, V., Banerjee, U., 2007. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev.* 21, 3044–3060. <https://doi.org/10.1101/gad.1602607>
- Matheson, L.S., Bolland, D.J., Chovanec, P., Krueger, F., Andrews, S., Koohy, H., Corcoran, A.E., 2017. Local Chromatin Features Including PU.1 and IKAROS Binding and H3K4 Methylation Shape the Repertoire of Immunoglobulin Kappa Genes Chosen for V(D)J Recombination. *Front Immunol* 8, 1550. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01550>
- Miller, A.H., Spencer, R.L., Pearce, B.D., Pisell, T.L., Azrieli, Y., Tanapat, P., Moday, H., Rhee, R., McEwen, B.S., 1998. Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. *Cell Immunol* 186, 45–54. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1293>
- Mills, P.J., Berry, C.C., Dimsdale, J.E., Ziegler, M.G., Nelesen, R.A., Kennedy, B.P., 1995. Lymphocyte Subset Redistribution in Response to Acute Experimental Stress: Effects of Gender, Ethnicity, Hypertension, and the Sympathetic Nervous System. *Brain, Behavior, and Immunity* 9, 61–69. <https://doi.org/10.1006/brbi.1995.1006>
- Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Rapalus, L., Ersoy, F., Campana, D., Conley, M.E., 1999. Mutations in Igα (CD79a) result in a complete block in B-cell development. *J. Clin. Invest.* 104, 1115–1121. <https://doi.org/10.1172/JCI7696>
- Miyazaki, K., Watanabe, H., Yoshikawa, G., Chen, K., Hidaka, R., Aitani, Y., Osawa, K., Takeda, R., Ochi, Y., Tani-ichi, S., Uehata, T., Takeuchi, O., Ikuta, K., Ogawa, S., Kondoh, G., Lin, Y.C., Ogata, H., Miyazaki, M., 2020. The transcription factor E2A activates multiple enhancers that drive Rag expression in developing T and B cells. *Sci Immunol* 5, eabb1455. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abb1455>
- Mizuta, R., Mizuta, M., Araki, S., Kitamura, D., 2002. RAG2 is down-regulated by cytoplasmic sequestration and ubiquitin-dependent degradation. *J Biol Chem* 277, 41423–41427. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206605200>
- 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, 869–877. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90030-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90030-g)



- Monici, M., Basile, V., Bellik, L., Fusi, F., Marziliano, N., Parenti, A., Romano, G., Conti, A., 2007. Does the exposure to microgravity affect dendritic cell maturation from monocytes? *Microgravity Sci. Technol* 19, 187–190. <https://doi.org/10.1007/BF02919479>
- Morey-Holton, E.R., Globus, R.K., 2002. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *Journal of Applied Physiology* 92, 1367–1377. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00969.2001>
- 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, 177–186. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00309-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00309-9)
- Nagaoka, H., Yu, W., Nussenzweig, M.C., 2000. Regulation of RAG expression in developing lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 12, 187–190. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(99\)00070-9](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)00070-9)
- Nagasawa, T., 2015. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Front Immunol* 6, 301. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00301>
- Naliboff, B.D., Benton, D., Solomon, G.F., Morley, J.E., Fahey, J.L., Bloom, E.T., Makinodan, T., Gilmore, S.L., 1991. Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress. *Psychosom Med* 53, 121–132. <https://doi.org/10.1097/00006842-199103000-00002>
- Navasiolava, N.M., Custaud, M.-A., Tomilovskaya, E.S., Larina, I.M., Mano, T., Gauquelin-Koch, G., Gharib, C., Kozlovskaya, I.B., 2011. Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur J Appl Physiol* 111, 1235–1260. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1750-x>
- Nelson, G.A., 2016. Space Radiation and Human Exposures, A Primer. *Radiat Res* 185, 349–358. <https://doi.org/10.1667/RR14311.1>
- Nemazee, D., 2017. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 17, 281–294. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.19>
- Nemazee, D., 2006. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 6, 728–740. <https://doi.org/10.1038/nri1939>
- Newman, D.J., 2000. Life in extreme environments: how will humans perform on Mars? *Gravit Space Biol Bull* 13, 35–47.
- Niemantsverdriet, M., van Goethem, M.-J., Bron, R., Hogewerf, W., Brandenburg, S., Langendijk, J.A., van Luijk, P., Coppes, R.P., 2012. High and low LET radiation differentially induce normal tissue damage signals. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83, 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.09.057>
- Novaes E Brito, R.R., Dos Santos Toledo, M., Labussiere, G.M., Dupin, T.V., De Campos Reis, N.F., Perez, E.C., Xander, P., 2019. B-1 cell response in immunity against parasites. *Parasitol Res* 118, 1343–1352. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06211-2>
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., Corcoran, L.M., 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 15, 160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>
- Olaru, A., 2004. Recombination signal sequence variations and the mechanism of patterned T-cell receptor- $\beta$  locus rearrangement. *Molecular Immunology* 40, 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.11.019>
- Opata, M.M., Stephens, R., 2013. Early Decision: Effector and Effector Memory T Cell Differentiation in Chronic Infection. *Curr Immunol Rev* 9, 190–206. <https://doi.org/10.2174/1573395509666131126231209>
- Özçivici, E., 2013. Effects of Spaceflight on Cells of Bone Marrow Origin. *tjh* 30, 1–7. <https://doi.org/10.4274/tjh.2012.0127>
- Pagel, J.I., Choukèr, A., 2016. Effects of isolation and confinement on humans-implications for manned space explorations. *Journal of Applied Physiology* 120, 1449–1457. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00928.2015>
- Palinkas, L.A., Gunderson, E.K., Johnson, J.C., Holland, A.W., 2000. Behavior and performance on long-duration spaceflights: evidence from analogue environments. *Aviat Space Environ Med* 71, A29–36.
- Palkovits, M., 1981. Catecholamines in the hypothalamus: an anatomical review. *Neuroendocrinology* 33, 123–128. <https://doi.org/10.1159/000123215>
- Panda, S., Zhang, J., Tan, N.S., Ho, B., Ding, J.L., 2013. Natural IgG antibodies provide innate protection against ficolin-opsonized bacteria: Natural IgG plays a pivotal role in immunity. *The EMBO Journal* 32, 2905–2919. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.199>



- Pandiarajan, M., Hargens, A.R., 2020. Ground-Based Analogs for Human Spaceflight. *Front. Physiol.* 11, 716. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00716>
- Pang, S.H.M., De Graaf, C.A., Hilton, D.J., Huntington, N.D., Carotta, S., Wu, L., Nutt, S.L., 2018. PU.1 Is Required for the Developmental Progression of Multipotent Progenitors to Common Lymphoid Progenitors. *Front. Immunol.* 9, 1264. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01264>
- Papaemmanuil, E., Rapado, I., Li, Y., Potter, N.E., Wedge, D.C., Tubio, J., Alexandrov, L.B., Van Loo, P., Cooke, S.L., Marshall, J., Martincorena, I., Hinton, J., Gundem, G., van Delft, F.W., Nik-Zainal, S., Jones, D.R., Ramakrishna, M., Tittley, I., Stebbings, L., Leroy, C., Menzies, A., Gamble, J., Robinson, B., Mudie, L., Raine, K., O'Meara, S., Teague, J.W., Butler, A.P., Cazzaniga, G., Biondi, A., Zuna, J., Kempster, H., Muschen, M., Ford, A.M., Stratton, M.R., Greaves, M., Campbell, P.J., 2014. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 46, 116–125. <https://doi.org/10.1038/ng.2874>
- Parkinson, N.J., Roddis, M., Ferneyhough, B., Zhang, G., Marsden, A.J., Maslau, S., Sanchez-Pearson, Y., Barthlott, T., Humphreys, I.R., Ladell, K., Price, D.A., Ponting, C.P., Hollander, G., Fischer, M.D., 2015. Violation of the 12/23 rule of genomic V(D)J recombination is common in lymphocytes. *Genome Res* 25, 226–234. <https://doi.org/10.1101/gr.179770.114>
- Patel, D.D., Kuchroo, V.K., 2015. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. *Immunity* 43, 1040–1051. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.12.003>
- Patel, P.D., Lopez, J.F., Lyons, D.M., Burke, S., Wallace, M., Schatzberg, A.F., 2000. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *Journal of Psychiatric Research* 34, 383–392. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(00\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(00)00035-2)
- Patel, S., 2020. The effects of microgravity and space radiation on cardiovascular health: From low-Earth orbit and beyond. *IJC Heart & Vasculature* 30, 100595. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2020.100595>
- Patton, D.T., Plumb, A.W., Abraham, N., 2014. The survival and differentiation of pro-B and pre-B cells in the bone marrow is dependent on IL-7R $\alpha$  Tyr449. *J Immunol* 193, 3446–3455. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302925>
- Paul, A.M., Mhatre, S.D., Cekanaviciute, E., Schreurs, A.-S., Tahimic, C.G.T., Globus, R.K., Anand, S., Crucian, B.E., Bhattacharya, S., 2020. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio: A Biomarker to Monitor the Immune Status of Astronauts. *Front. Immunol.* 11, 564950. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.564950>
- Pelanda, R., Greaves, S.A., Alves da Costa, T., Cedrone, L.M., Campbell, M.L., Torres, R.M., 2022. B-cell intrinsic and extrinsic signals that regulate central tolerance of mouse and human B cells. *Immunol Rev* 307, 12–26. <https://doi.org/10.1111/imr.13062>
- Perhonen, M.A., Franco, F., Lane, L.D., Buckley, J.C., Blomqvist, C.G., Zerwekh, J.E., Peshock, R.M., Weatherall, P.T., Levine, B.D., 2001. Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight. *J Appl Physiol* (1985) 91, 645–653. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.2.645>
- Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Göttgens, B., Passegué, E., 2015. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* 17, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>
- Plett, P.A., Abonour, R., Frankovitz, S.M., Orschell, C.M., 2004. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 32, 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.03.014>
- Plett, P.A., Frankovitz, S.M., Abonour, R., Orschell-Traycoff, C.M., 2001. Proliferation of human hematopoietic bone marrow cells in simulated microgravity. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37, 73–78. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2001\)037<0073:POHHBM>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2001)037<0073:POHHBM>2.0.CO;2)
- Powers, S.E., Mandal, M., Matsuda, S., Miletic, A.V., Cato, M.H., Tanaka, A., Rickert, R.C., Koyasu, S., Clark, M.R., 2012. Subnuclear cyclin D3 compartments and the coordinated regulation of proliferation and immunoglobulin variable gene repression. *J Exp Med* 209, 2199–2213. <https://doi.org/10.1084/jem.20120800>
- Pryor, J.M., Waters, C.A., Aza, A., Asagoshi, K., Strom, C., Mieczkowski, P.A., Blanco, L., Ramsden, D.A., 2015. Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E4537–4545. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505805112>



- Raaphorst, F.M., Raman, C.S., Tami, J., Fischbach, M., Sanz, I., 1997. Human Ig heavy chain CDR3 regions in adult bone marrow pre-B cells display an adult phenotype of diversity: evidence for structural selection of DH amino acid sequences. *Int Immunol* 9, 1503–1515. <https://doi.org/10.1093/intimm/9.10.1503>
- Radic, M.Z., Erikson, J., Litwin, S., Weigert, M., 1993. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med* 177, 1165–1173. <https://doi.org/10.1084/jem.177.4.1165>
- Ranabir, S., Reetu, K., 2011. Stress and hormones. *Indian J Endocrinol Metab* 15, 18–22. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.77573>
- Rettig, T.A., Nishiyama, N.C., Pecaat, M.J., Chapes, S.K., 2019. Effects of skeletal unloading on the bone marrow antibody repertoire of tetanus toxoid and/or CpG treated C57BL/6J mice. *Life Sci Space Res (Amst)* 22, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2019.06.001>
- Rettig, T.A., Tan, J.C., Nishiyama, N.C., Chapes, S.K., Pecaat, M.J., 2021. An Analysis of the Effects of Spaceflight and Vaccination on Antibody Repertoire Diversity. *Immunohorizons* 5, 675–686. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2100056>
- Rickert, R.C., 2013. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol* 13, 578–591. <https://doi.org/10.1038/nri3487>
- Robin, A., Van Ombergen, A., Laurens, C., Bergouignan, A., Vico, L., Linossier, M.-T., Pavy-Le Traon, A., Kermorgant, M., Chopard, A., Py, G., Green, D.A., Tipton, M., Choukér, A., Denise, P., Normand, H., Blanc, S., Simon, C., Rosnet, E., Larcher, F., Fernandez, P., De Glisezinski, I., Larrouy, D., Harant-Farrugia, I., Antunes, I., Gauquelin-Koch, G., Bareille, M.-P., Billette De Villemeur, R., Custaud, M.-A., Navasiolava, N., 2023. Comprehensive assessment of physiological responses in women during the ESA dry immersion VIVALDI microgravity simulation. *Nat Commun* 14, 6311. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41990-4>
- Rodgers, K.K., 2017. Riches in RAGs: Revealing the V(D)J Recombinase through High-Resolution Structures. *Trends Biochem Sci* 42, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.10.003>
- Rodriguez-Zhurbenko, N., Quach, T.D., Hopkins, T.J., Rothstein, T.L., Hernandez, A.M., 2019. Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. *Front Immunol* 10, 483. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00483>
- Roldán, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., Skok, J.A., 2005. Locus “decontraction” and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat Immunol* 6, 31–41. <https://doi.org/10.1038/ni1150>
- Rolink, A.G., Winkler, T., Melchers, F., Andersson, J., 2000. Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *J Exp Med* 191, 23–32. <https://doi.org/10.1084/jem.191.1.23>
- Romanow, W.J., Langerak, A.W., Goebel, P., Wolvers-Tettero, I.L.M., Van Dongen, J.J.M., Feeney, A.J., Murre, C., 2000. E2A and EBF Act in Synergy with the V(D)J Recombinase to Generate a Diverse Immunoglobulin Repertoire in Nonlymphoid Cells. *Molecular Cell* 5, 343–353. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80429-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80429-3)
- Rossi, B., Espeli, M., Schiff, C., Gauthier, L., 2006. Clustering of pre-B cell integrins induces galectin-1-dependent pre-B cell receptor relocalization and activation. *J Immunol* 177, 796–803. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.796>
- Roth, D.B., 2014. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol Spectr* 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0041-2014>
- Rothenberg, E.V., 2016. Multiple Curricula for B Cell Developmental Programming. *Immunity* 45, 457–458. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.005>
- Rothstein, T.L., Quach, T.D., 2015. The human counterpart of mouse B-1 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1362, 143–152. <https://doi.org/10.1111/nyas.12790>
- Ru, H., Chambers, M.G., Fu, T.-M., Tong, A.B., Liao, M., Wu, H., 2015. Molecular Mechanism of V(D)J Recombination from Synaptic RAG1-RAG2 Complex Structures. *Cell* 163, 1138–1152. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.055>
- Saijo, K., Schmedt, C., Su, I.-H., Karasuyama, H., Lowell, C.A., Reth, M., Adachi, T., Patke, A., Santana, A., Tarakhovsky, A., 2003. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat Immunol* 4, 274–279. <https://doi.org/10.1038/ni893>



- Salam, A.P., 2020. Exploration Class Missions on Earth: Lessons Learnt from Life in Extreme Antarctic Isolation and Confinement, in: Choukèr, A. (Ed.), *Stress Challenges and Immunity in Space*. Springer International Publishing, Cham, pp. 693–707. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16996-1\\_38](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16996-1_38)
- Sandal, G.M., Van de Vijver, F.J.R., Smith, N., 2018. Psychological Hibernation in Antarctica. *Front. Psychol.* 9, 2235. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02235>
- Sandel, P.C., Monroe, J.G., 1999. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* 10, 289–299. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80029-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80029-1)
- Saravia, J., Chapman, N.M., Chi, H., 2019. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol* 16, 634–643. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0220-6>
- Saul, A.N., Oberyszyn, T.M., Daugherty, C., Kusewitt, D., Jones, S., Jewell, S., Malarkey, W.B., Lehman, A., Lemeshow, S., Dhabhar, F.S., 2005. Chronic Stress and Susceptibility to Skin Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 97, 1760–1767. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji401>
- Savary, C.A., Graziuti, M.L., Przepiorka, D., Tomasovic, S.P., McIntyre, B.W., Woodside, D.G., Pellis, N.R., Pierson, D.L., Rex, J.H., 2001. Characteristics of human dendritic cells generated in a microgravity analog culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37, 216–222. <https://doi.org/10.1007/BF02577532>
- Saveko, A., Bekreneva, M., Ponomarev, I., Zelenskaya, I., Riabova, A., Shigueva, T., Kitov, V., Abu Sheli, N., Nosikova, I., Rukavishnikov, I., Sayenko, D., Tomilovskaya, E., 2023. Impact of different ground-based microgravity models on human sensorimotor system. *Front. Physiol.* 14, 1085545. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1085545>
- Savina, A., Amigorena, S., 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews* 219, 143–156. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x>
- Schlissel, M., 2002. Allelic exclusion of immunoglobulin gene rearrangement and expression: why and how? *Semin Immunol* 14, 207–212; discussion 225–226. [https://doi.org/10.1016/s1044-5323\(02\)00044-1](https://doi.org/10.1016/s1044-5323(02)00044-1)
- Schram, B.R., Tze, L.E., Ramsey, L.B., Liu, J., Najera, L., Vegoe, A.L., Hardy, R.R., Hippen, K.L., Farrar, M.A., Behrens, T.W., 2008. B cell receptor basal signaling regulates antigen-induced Ig light chain rearrangements. *J Immunol* 180, 4728–4741. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4728>
- Schroeder, H.W., 2006. Similarity and divergence in the development and expression of the mouse and human antibody repertoires. *Developmental & Comparative Immunology* 30, 119–135. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.006>
- Seckl, J.R., Dickson, K.L., Yates, C., Fink, G., 1991. Distribution of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNA expression in human postmortem hippocampus. *Brain Research* 561, 332–337. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91612-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91612-5)
- Segerstrom, S.C., Miller, G.E., 2004. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull* 130, 601–630. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.4.601>
- Segura, E., Amigorena, S., 2013. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends in Immunology* 34, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.06.001>
- Selye, H., 1974. *Stress without distress*. Lippincott, Philadelphia.
- Selye, H., 1936. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138, 32–32. <https://doi.org/10.1038/138032a0>
- Sheng, J.A., Bales, N.J., Myers, S.A., Bautista, A.I., Roueifar, M., Hale, T.M., Handa, R.J., 2020. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Development, Programming Actions of Hormones, and Maternal-Fetal Interactions. *Front Behav Neurosci* 14, 601939. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.601939>
- Shi, L., Tian, H., Wang, P., Li, L., Zhang, Z., Zhang, J., Zhao, Y., 2021. Spaceflight and simulated microgravity suppresses macrophage development via altered RAS/ERK/NFκB and metabolic pathways. *Cell Mol Immunol* 18, 1489–1502. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0346-6>
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855–867. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90029-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90029-c)



- Shukla, V., Vaissière, T., Herceg, Z., 2008. Histone acetylation and chromatin signature in stem cell identity and cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 637, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.07.012>
- Sims, G.P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., Lipsky, P.E., 2005. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105, 4390–4398. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4284>
- Singh, S.K., Gellert, M., 2015. Role of RAG1 autoubiquitination in V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 8579–8583. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510464112>
- Sklar, L.S., Anisman, H., 1981. Stress and cancer. *Psychol Bull* 89, 369–406.
- Skok, J.A., Brown, K.E., Azuara, V., Caparros, M.L., Baxter, J., Takacs, K., Dillon, N., Gray, D., Perry, R.P., Merckenschlager, M., Fisher, A.G., 2001. Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat Immunol* 2, 848–854. <https://doi.org/10.1038/ni0901-848>
- Smith, F.L., Baumgarth, N., 2019. B-1 cell responses to infections. *Current Opinion in Immunology* 57, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.12.001>
- Smith, S.M., Vale, W.W., 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 8, 383–395. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2006.8.4/ssmith>
- Sommerkamp, P., Romero-Mulero, M.C., Narr, A., Ladel, L., Hustin, L., Schönberger, K., Renders, S., Altamura, S., Zeisberger, P., Jäcklein, K., Klimmeck, D., Rodriguez-Fraticelli, A., Camargo, F.D., Perié, L., Trumpp, A., Cabezas-Wallscheid, N., 2021. Mouse multipotent progenitor 5 cells are located at the interphase between hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 137, 3218–3224. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007876>
- Sotnezova, E.V., Markina, E.A., Andreeva, E.R., Buravkova, L.B., 2017. Myeloid Precursors in the Bone Marrow of Mice after a 30-Day Space Mission on a Bion-M1 Biosatellite. *Bull Exp Biol Med* 162, 496–500. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3647-8>
- Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., Busslinger, M., 2002. Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17, 781–793. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00472-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00472-7)
- Spielmann, G., Agha, N., Kunz, H., Simpson, R.J., Crucian, B., Mehta, S., Laughlin, M., Campbell, J., 2019a. B cell homeostasis is maintained during long-duration spaceflight. *J Appl Physiol (1985)* 126, 469–476. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00789.2018>
- Spielmann, G., Agha, N., Kunz, H., Simpson, R.J., Crucian, B., Mehta, S., Laughlin, M., Campbell, J., 2019b. B cell homeostasis is maintained during long-duration spaceflight. *Journal of Applied Physiology* 126, 469–476. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00789.2018>
- Spivakov, M., Fisher, A.G., 2007. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet* 8, 263–271. <https://doi.org/10.1038/nrg2046>
- Stall, A.M., Adams, S., Herzenberg, L.A., Kantor, A.B., 1992. Characteristics and Development of the Murine B-1b (Ly-1 B Sister) Cell Population. *Annals of the New York Academy of Sciences* 651, 33–43. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb24591.x>
- Stephens, M.A.C., Wand, G., 2012. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol Res* 34, 468–483.
- Strewe, C., Moser, D., Buchheim, J.-I., Gunga, H.-C., Stahn, A., Crucian, B.E., Fiedel, B., Bauer, H., Gössmann-Lang, P., Thieme, D., Kohlberg, E., Choukèr, A., Feuerecker, M., 2019. Sex differences in stress and immune responses during confinement in Antarctica. *Biol Sex Differ* 10, 20. <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0231-0>
- Strollo, F., Vernikos, J., 2021. Aging-like metabolic and adrenal changes in microgravity: State of the art in preparation for Mars. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 126, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.01.028>
- Stuster, J.W., 2000. Bold endeavors: behavioral lessons from polar and space exploration. *Gravit Space Biol Bull* 13, 49–57.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., Nagasawa, T., 2006. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* 25, 977–988. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.016>



- Tabibian-Keissar, H., Hazanov, L., Schiby, G., Rosenthal, N., Rakovsky, A., Michaeli, M., Shahaf, G.L., Pickman, Y., Rosenblatt, K., Melamed, D., Dunn-Walters, D., Mehr, R., Barshack, I., 2016. Aging affects B-cell antigen receptor repertoire diversity in primary and secondary lymphoid tissues. *Eur J Immunol* 46, 480–492. <https://doi.org/10.1002/eji.201545586>
- Tascher, G., Gerbaix, M., Maes, P., Chazarin, B., Ghislin, S., Antropova, E., Vassilieva, G., Ouzren-Zarhloul, N., Gauquelin-Koch, G., Vico, L., Fripiat, J.-P., Bertile, F., 2019. Analysis of femurs from mice embarked on board BION-M1 biosatellite reveals a decrease in immune cell development, including B cells, after 1 wk of recovery on Earth. *FASEB J* 33, 3772–3783. <https://doi.org/10.1096/fj.201801463R>
- Teng, G., Schatz, D.G., 2015. Regulation and Evolution of the RAG Recombinase. *Adv Immunol* 128, 1–39. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.07.002>
- Thirsk, R., Kuipers, A., Mukai, C., Williams, D., 2009. The space-flight environment: the International Space Station and beyond. *Canadian Medical Association Journal* 180, 1216–1220. <https://doi.org/10.1503/cmaj.081125>
- Thornton, W.E., Linder, B.J., Moore, T.P., Pool, S.L., 1987. Gastrointestinal motility in space motion sickness. *Aviat Space Environ Med* 58, A16-21.
- Tierney, B.T., Kim, J., Overbey, E.G., Ryon, K.A., Foux, J., Sierra, M.A., Bhattacharya, C., Damle, N., Najjar, D., Park, J., Garcia Medina, J.S., Houerbi, N., Meydan, C., Wain Hirschberg, J., Qiu, J., Kleinman, A.S., Al-Ghalith, G.A., MacKay, M., Afshin, E.E., Dhir, R., Borg, J., Gatt, C., Brereton, N., Readhead, B.P., Beyaz, S., Venkateswaran, K.J., Wiseman, K., Moreno, J., Boddicker, A.M., Zhao, J., Lajoie, B.R., Scott, R.T., Altomare, A., Kruglyak, S., Levy, S., Church, G.M., Mason, C.E., 2024. Longitudinal multi-omics analysis of host microbiome architecture and immune responses during short-term spaceflight. *Nat Microbiol* 9, 1661–1675. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01635-8>
- Timblin, G.A., Schlissel, M.S., 2013. Ebf1 and c-Myb repress rag transcription downstream of Stat5 during early B cell development. *J Immunol* 191, 4676–4687. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301675>
- Tkachenko, A., Kupcova, K., Havranek, O., 2023. B-Cell Receptor Signaling and Beyond: The Role of Ig $\alpha$  (CD79a)/Ig $\beta$  (CD79b) in Normal and Malignant B Cells. *IJMS* 25, 10. <https://doi.org/10.3390/ijms25010010>
- Tomilovskaya, E., Shigueva, T., Sayenko, D., Rukavishnikov, I., Kozlovskaya, I., 2019. Dry Immersion as a Ground-Based Model of Microgravity Physiological Effects. *Front Physiol* 10, 284. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00284>
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581. <https://doi.org/10.1038/302575a0>
- Touarin, P., Serrano, B., Courbois, A., Bornet, O., Chen, Q., Scott, L.G., Williamson, J.R., Sebban-Kreuzer, C., Mancini, S.J.C., Elantak, L., 2024. Pre-B cell receptor acts as a selectivity switch for galectin-1 at the pre-B cell surface. *Cell Rep* 43, 114541. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114541>
- Truong, L.N., Li, Y., Sun, E., Ang, K., Hwang, P.Y.-H., Wu, X., 2014. Homologous recombination is a primary pathway to repair DNA double-strand breaks generated during DNA rereplication. *J Biol Chem* 289, 28910–28923. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576488>
- Turrioni, S., Magnani, M., Kc, P., Lesnik, P., Vidal, H., Heer, M., 2020. Gut Microbiome and Space Travelers' Health: State of the Art and Possible Pro/Prebiotic Strategies for Long-Term Space Missions. *Front Physiol* 11, 553929. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.553929>
- Übelhart, R., Werner, M., Jumaa, H., 2015. Assembly and Function of the Precursor B-Cell Receptor, in: Kurosaki, T., Wienands, J. (Eds.), *B Cell Receptor Signaling, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–25. [https://doi.org/10.1007/82\\_2015\\_475](https://doi.org/10.1007/82_2015_475)
- Ullrich, O., Thiel, C.S., 2012. Gravitational Force: Triggered Stress in Cells of the Immune System, in: Chouker, A. (Ed.), *Stress Challenges and Immunity in Space*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 187–202. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22272-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22272-6_14)
- Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10, 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Van Ombergen, A., Rossiter, A., Ngo-Anh, T.J., 2021. 'White Mars' – nearly two decades of biomedical research at the Antarctic Concordia station. *Exp Physiol* 106, 6–17. <https://doi.org/10.1113/EP088352>



- Vela, J.L., Ait-Azzouzene, D., Duong, B.H., Ota, T., Nemazee, D., 2008. Rearrangement of mouse immunoglobulin kappa deleting element recombining sequence promotes immune tolerance and lambda B cell production. *Immunity* 28, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.12.011>
- Verkoczy, L., Duong, B., Skog, P., Ait-Azzouzene, D., Puri, K., Vela, J.L., Nemazee, D., 2007. Basal B cell receptor-directed phosphatidylinositol 3-kinase signaling turns off RAGs and promotes B cell-positive selection. *J Immunol* 178, 6332–6341. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6332>
- Vettermann, C., Herrmann, K., Albert, C., Roth, E., Bösl, M.R., Jäck, H.-M., 2008. A Unique Role for the  $\lambda$ 5 Nonimmunoglobulin Tail in Early B Lymphocyte Development. *The Journal of Immunology* 181, 3232–3242. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3232>
- Vico, L., Collet, P., Guignandon, A., Lafage-Proust, M.H., Thomas, T., Rehaillia, M., Alexandre, C., 2000. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. *Lancet* 355, 1607–1611. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)02217-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02217-0)
- Vilagos, B., Hoffmann, M., Souabni, A., Sun, Q., Werner, B., Medvedovic, J., Bilic, I., Minnich, M., Axelsson, E., Jaritz, M., Busslinger, M., 2012. Essential role of EBF1 in the generation and function of distinct mature B cell types. *Journal of Experimental Medicine* 209, 775–792. <https://doi.org/10.1084/jem.20112422>
- Vogel, J., Thiel, C.S., Tauber, S., Stockmann, C., Gassmann, M., Ullrich, O., 2019. Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and Genes of Related Pathways in Altered Gravity. *Int J Mol Sci* 20, E436. <https://doi.org/10.3390/ijms20020436>
- Voorhies, A.A., Mark Ott, C., Mehta, S., Pierson, D.L., Crucian, B.E., Feiveson, A., Oubre, C.M., Torralba, M., Moncera, K., Zhang, Y., Zurek, E., Lorenzi, H.A., 2019. Study of the impact of long-duration space missions at the International Space Station on the astronaut microbiome. *Sci Rep* 9, 9911. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46303-8>
- Wadhwa, A., Moreno-Villanueva, M., Crucian, B., Wu, H., 2024. Synergistic interplay between radiation and microgravity in spaceflight-related immunological health risks. *Immun Ageing* 21, 50. <https://doi.org/10.1186/s12979-024-00449-w>
- Wang, J.-Y. (Ed.), 2020. *B Cells in Immunity and Tolerance, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1>
- Wang, P., Tian, H., Zhang, J., Qian, J., Li, L., Shi, L., Zhao, Y., 2019. Spaceflight/microgravity inhibits the proliferation of hematopoietic stem cells by decreasing Kit-Ras/cAMP-CREB pathway networks as evidenced by RNA-Seq assays. *FASEB J* 33, 5903–5913. <https://doi.org/10.1096/fj.201802413R>
- Ward, C., Rettig, T.A., Hlavacek, S., Bye, B.A., Pecaut, M.J., Chapes, S.K., 2018. Effects of spaceflight on the immunoglobulin repertoire of unimmunized C57BL/6 mice. *Life Sci Space Res (Amst)* 16, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2017.11.003>
- Webster, S.E., Ryali, B., Clemente, M.J., Tsuji, N.L., Holodick, N.E., 2022. Sex Influences Age-Related Changes in Natural Antibodies and CD5+ B-1 Cells. *J Immunol* 208, 1755–1771. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2101150>
- Wei, H., Yu, X., 2016. Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 14, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.001>
- Williams, D., Kuipers, A., Mukai, C., Thirsk, R., 2009. Acclimation during space flight: effects on human physiology. *CMAJ* 180, 1317–1323. <https://doi.org/10.1503/cmaj.090628>
- Wohleb, E.S., Hanke, M.L., Corona, A.W., Powell, N.D., Stiner, L.M., Bailey, M.T., Nelson, R.J., Godbout, J.P., Sheridan, J.F., 2011.  $\beta$ -Adrenergic Receptor Antagonism Prevents Anxiety-Like Behavior and Microglial Reactivity Induced by Repeated Social Defeat. *J. Neurosci.* 31, 6277–6288. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0450-11.2011>
- Wu, B., Wang, Y., Wu, X., Liu, D., Xu, D., Wang, F., 2018. On-orbit sleep problems of astronauts and countermeasures. *Mil Med Res* 5, 17. <https://doi.org/10.1186/s40779-018-0165-6>
- Wu, Y., Chen, Y., Yang, X., Chen, L., Yang, Y., 2016. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) were associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol* 36, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.006>
- 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, 1362–1369. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1362>



- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., Casali, P., 2012. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* 12, 517–531. <https://doi.org/10.1038/nri3216>
- 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, 478–482. <https://doi.org/10.1038/nature06020>
- Yel, L., Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Buckley, R.H., Trübel, H., Pachman, L.M., Kitchingman, G.R., Campana, D., Rohrer, J., Conley, M.E., 1996. Mutations in the mu heavy-chain gene in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 335, 1486–1493. <https://doi.org/10.1056/NEJM199611143352003>
- Yi, B., Rykova, M., Feuerecker, M., Jäger, B., Ladinig, C., Basner, M., Hörl, M., Matzel, S., Kaufmann, I., Strewe, C., Nichiporuk, I., Vassilieva, G., Rinas, K., Baatout, S., Schelling, G., Thiel, M., Dinges, D.F., Morukov, B., Choukèr, A., 2014. 520-d Isolation and confinement simulating a flight to Mars reveals heightened immune responses and alterations of leukocyte phenotype. *Brain, Behavior, and Immunity* 40, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.018>
- Yin, Y., Liu, J., Fan, Q., Zhao, S., Wu, X., Wang, J., Liu, Y., Li, Y., Lu, W., 2023. Long-term spaceflight composite stress induces depression and cognitive impairment in astronauts—insights from neuroplasticity. *Transl Psychiatry* 13, 342. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02638-5>
- Young, L.R., Oman, C.M., Watt, D.G., Money, K.E., Lichtenberg, B.K., 1984. Spatial orientation in weightlessness and readaptation to earth's gravity. *Science* 225, 205–208. <https://doi.org/10.1126/science.6610215>
- Yurchenko, V., Xue, Z., Sadofsky, M., 2003. The RAG1 N-terminal domain is an E3 ubiquitin ligase. *Genes Dev* 17, 581–585. <https://doi.org/10.1101/gad.1058103>
- Zeitlin, C., Hassler, D.M., Cucinotta, F.A., Ehresmann, B., Wimmer-Schweingruber, R.F., Brinza, D.E., Kang, S., Weigle, G., Böttcher, S., Böhm, E., Burmeister, S., Guo, J., Köhler, J., Martin, C., Posner, A., Rafkin, S., Reitz, G., 2013. Measurements of energetic particle radiation in transit to Mars on the Mars Science Laboratory. *Science* 340, 1080–1084. <https://doi.org/10.1126/science.1235989>
- Zhang, M., Srivastava, G., Lu, L., 2004. The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell Mol Immunol* 1, 89–94.
- Zhang, Y., Garcia-Ibanez, L., Toellner, K.-M., 2016. Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev* 270, 8–19. <https://doi.org/10.1111/imr.12396>
- Zhang, Y., Zhang, X., Dai, H.-Q., Hu, H., Alt, F.W., 2022. The role of chromatin loop extrusion in antibody diversification. *Nat Rev Immunol* 22, 550–566. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00679-3>
- Zielinski, C.E., 2023. T helper cell subsets: diversification of the field. *Eur J Immunol* 53, 2250218. <https://doi.org/10.1002/eji.202250218>
- Zouali, M., Richard, Y., 2011. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Front Immunol* 2, 63. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00063>



# ANNEXE 1

## Revue :

Next generation of astronauts or ESA astronaut 2.0 concept and spotlight on  
immunity

Pauline Jacob, Christian Oertlin, Bjorn Baselet, Lisa S. Westerberg, Jean-Pol Frippiat and Sarah  
Baatout

*NPJ microgravity* vol. 9,1 51. 28 Jun. 2023,



## REVIEW ARTICLE OPEN



# Next generation of astronauts or ESA astronaut 2.0 concept and spotlight on immunity

Pauline Jacob<sup>1,5</sup>, Christian Oertlin<sup>2,5</sup>, Bjorn Baselet<sup>3,5</sup>, Lisa S. Westerberg<sup>4,6</sup>, Jean-Pol Fripiat<sup>1,6</sup> and Sarah Baatout<sup>3,4,6</sup>✉

Although we have sent humans into space for more than 50 years, crucial questions regarding immune response in space conditions remain unanswered. There are many complex interactions between the immune system and other physiological systems in the human body. This makes it difficult to study the combined long-term effects of space stressors such as radiation and microgravity. In particular, exposure to microgravity and cosmic radiation may produce changes in the performance of the immune system at the cellular and molecular levels and in the major physiological systems of the body. Consequently, abnormal immune responses induced in the space environment may have serious health consequences, especially in future long-term space missions. In particular, radiation-induced immune effects pose significant health challenges for long-duration space exploration missions with potential risks to reduce the organism's ability to respond to injuries, infections, and vaccines, and predispose astronauts to the onset of chronic diseases (e.g., immunosuppression, cardiovascular and metabolic diseases, gut dysbiosis). Other deleterious effects encountered by radiation may include cancer and premature aging, induced by dysregulated redox and metabolic processes, microbiota, immune cell function, endotoxin, and pro-inflammatory signal production<sup>1,2</sup>. In this review, we summarize and highlight the current understanding of the effects of microgravity and radiation on the immune system and discuss knowledge gaps that future studies should address.

*npj Microgravity* (2023)9:51 ; <https://doi.org/10.1038/s41526-023-00294-z>

## INTRODUCTION

The European Space Agency (ESA) aims to expand the reach of humanity into space. Space is an extremely hostile environment that poses threats to human health. One such threat is the well-established induction of immune system alterations in astronauts during spaceflight that persist after return<sup>3–6</sup>. The immune system protects against invading pathogens, toxins, and cancer cells and dysregulation thereof can lead to drastic consequences during space missions. Therefore, it is warranted to put a spotlight on current research that encompasses the immune system, space, and space analogs to assess risks, formulate countermeasures, and direct future research.

In 2021, ESA launched the Terrae Novae program to lead Europe's human journey into the Solar system using both robots as precursors as well as astronauts, and to return the benefits of exploration back to society. Terrae Novae has the literal meaning of 'New Worlds' that includes the three ESA exploration destinations: Low Earth Orbit (LEO), Moon, and Mars. It is therefore expected that a new generation of astronauts will be associated with the Terrae Novae program ensuring a broad demographic representation and supporting a wide range of mission profiles. These astronauts will undergo rigorous pre-flight screening to predict and mitigate their reactions to the space environment, and preserve their well-being using inflight tools available to them. These tools will range from managing group dynamics to improved communication facilities, interfacing with diagnostic devices, and artificial intelligence to assist with inflight health monitoring.

In this context, ESA invited the scientific community to prepare white papers, of which one was focused on the immune system, to identify key knowledge gaps, and to provide recommendations for

future research. The white paper for the immune system was thereafter reviewed by the space scientific community in Immunology and amended accordingly ([https://esamultimedia.esa.int/docs/HRE/12\\_HumanResearch\\_HumanPhysiology.pdf](https://esamultimedia.esa.int/docs/HRE/12_HumanResearch_HumanPhysiology.pdf)). In this review, we present an overview of current knowledge about the effects of spaceflight on immune cells and the immune system in general, as well as the main outcomes of this white paper.

## EFFECTS OF SPACE CONDITIONS ON THE IMMUNE SYSTEM

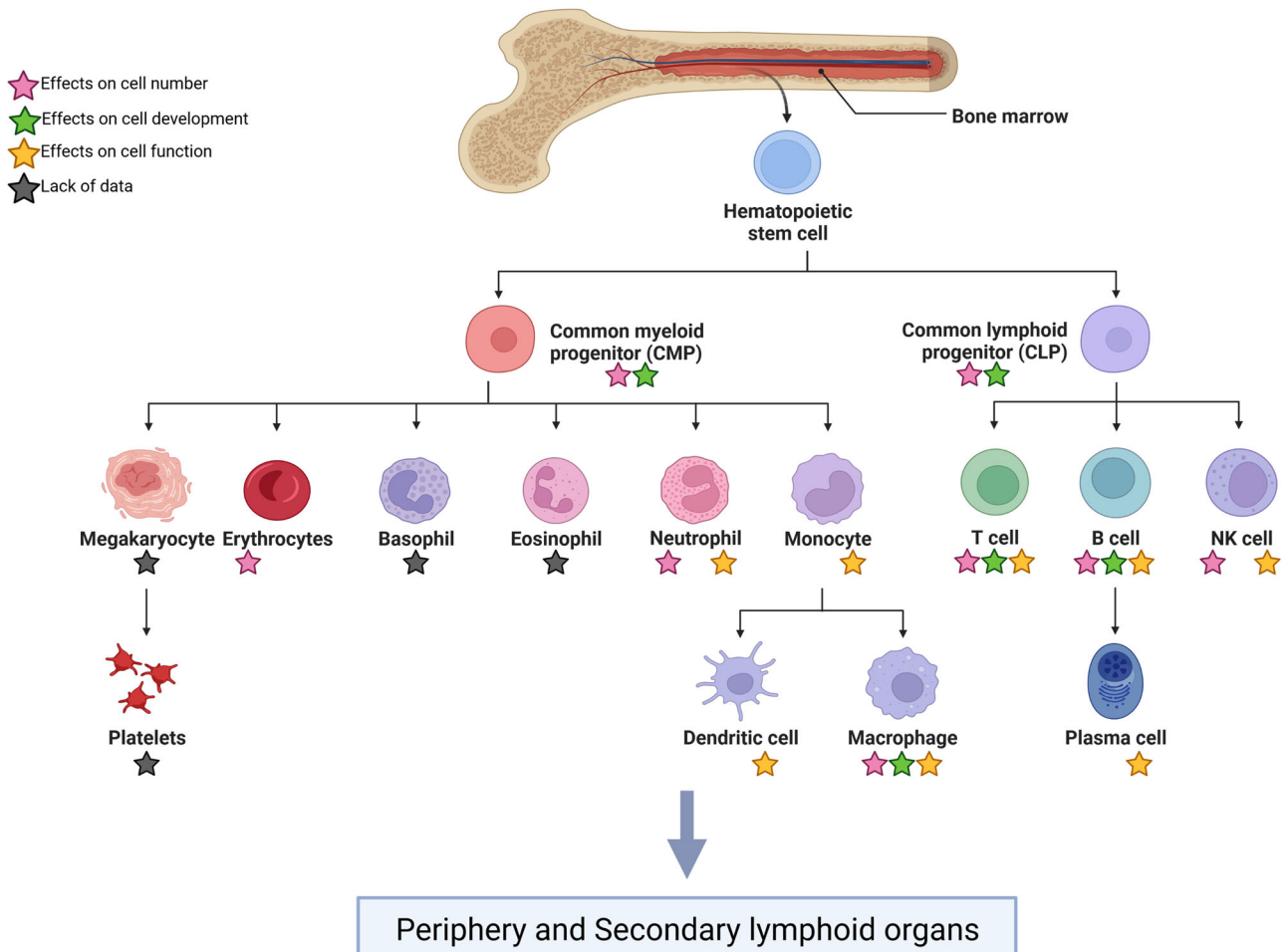
### General overview of the immune system

Skin and epithelias are the largest organs of the human body and represent a first line of defense<sup>7</sup>. Non-immune cells present in these tissues are equipped with pattern recognition receptors (PRR) of which the activation leads to the production of chemokines and cytokines that activate the immune system<sup>8</sup>. Furthermore, the skin contains resident myeloid and lymphoid immune cells including T lymphocytes, monocyte-derived dendritic cells as well as macrophages<sup>8</sup>. While the barrier function of these tissues provides protection against infiltration of pathogens, the gut provides an environment that hosts a large microbiome<sup>9</sup>. This microbiome plays a role in central nervous system regulation, energy metabolism but also in the immune system<sup>9</sup>. The immune system interacts with numerous systems (e.g., the central nervous, the cardiovascular, the musculoskeletal, the reproductive, the respiratory, and the digestive systems) of which the interplay with gut microbiome is of particular importance as its dysregulation can lead to disease such as inflammatory bowel disease (IBD)<sup>9</sup>.

Immune cells contribute to innate and adaptive immunity. Granulocytes, monocytes, macrophages, and NK cells are part of

<sup>1</sup>Stress Immunity Pathogens Laboratory, UR 7300 SIMPA, Faculty of Medicine, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France. <sup>2</sup>Karolinska Institutet, Department of Microbiology Tumor and Cell biology, Stockholm SE-17177, Sweden. <sup>3</sup>Radiobiology Unit, Belgian Nuclear Research Centre, SCK CEN, Mol, Belgium. <sup>4</sup>Department of Molecular Biotechnology, Gent University, Gent, Belgium. <sup>5</sup>These authors contributed equally: Pauline Jacob, Christian Oertlin, Bjorn Baselet. <sup>6</sup>These authors jointly supervised this work: Lisa S. Westerberg, Jean-Pol Fripiat, Sarah Baatout. ✉email: sarah.baatout@sckcen.be





**Fig. 1 Effect of spaceflight-associated stressors on immune cell number, development, and function.** Immune cells derive from self-renewing hematopoietic stem cells. These cells differentiate into common myeloid progenitor cells (CMP) and common lymphoid progenitor cells (CLP). CMP form megakaryocytes, erythrocytes, basophils, eosinophils, neutrophils, and monocytes which can give rise to dendritic cells and macrophages, whereas CLP differentiate into T cells, B cells which can give rise to plasma cells, and natural killer (NK) cells. Stars indicate if spaceflight-associated stressors affect the number (pink), the development (green), and/or the function (yellow) of each cell type. A black star indicates a lack of data. Created with BioRender.com.

the fast-responding innate immune system. Dendritic cells bridge the innate immune response to the slow-responding and highly specific adaptive immune system consisting of B and T cells. All these cells derive from self-renewing hematopoietic stem cells (HSC). HSC differentiate into common myeloid progenitor cells (CMP) as well as common lymphoid progenitor cells (CLP). CMP form megakaryocytes, erythrocytes, basophils, eosinophils, neutrophils, monocytes, dendritic cells, and macrophages whereas CLP differentiate into T cells, B cells, and natural killer (NK) cells (DC) (Fig. 1).

### Effects on immune cell differentiation

A number of studies have analyzed the impact of spaceflight on the development of immune cells<sup>6</sup>. A decrease in the number of granulocyte and monocyte progenitors was reported in rodents that have been in space or subjected to anti-orthostatic suspension (AOS, a model used to mimic physiological changes observed during a spaceflight)<sup>10–12</sup>. The inflight culture of human CD34<sup>+</sup> progenitors revealed an inhibitory effect on red blood cell production<sup>13</sup>. A study using an amphibian model<sup>14</sup> showed that the transcription of IgM heavy chain was increased, which was associated with the decreased expression of the lymphoid-determining transcription factor Ikaros<sup>15</sup>, thereby suggesting an effect on B cell development. This perturbation of B lymphopoiesis

was confirmed in mice submitted to 21 days of AOS. In this study, a reduced proportion of CLPs, pro-B cells, and pre-B cells along with an alteration of femoral bone structure was noted<sup>16</sup>. In the same way, analysis of femurs of mice flown for one month onboard the BION-M1 satellite showed an altered expression of numerous proteins required for bone and immune cell development<sup>17</sup>. Furthermore, a reduction in B cells in the bone marrow and spleen one week after landing was evidenced<sup>17</sup>. T lymphopoiesis is also altered by microgravity, as a decrease in double-positive (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) and single-positive (CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) T cell maturation stages were observed when murine fetal thymuses were cultivated under simulated microgravity (μg)<sup>18</sup>. A significant suppression of thymopoiesis was also noted in 16 astronauts upon return from spaceflight<sup>19</sup>. Analysis of the impact of being conceived and born under increased g force (2 G) on the murine T cell antigen receptor (TCR) repertoire revealed a disruption in TCR signaling and in the diversity of this receptor binding sites<sup>20</sup>. Finally, it was shown that a model mimicking socioenvironmental stress experienced by astronauts also modifies the murine TCR repertoire created during T lymphopoiesis<sup>21</sup>.

### Effects on mature immune cells

**Neutrophils.** Neutrophils are the most abundant type of granulocytes and the first responders at the site of an infection.



Neutrophils are recruited in large numbers from the blood, through the endothelium, to the infected tissue where they release vesicles loaded with proteolytic enzymes and antimicrobial peptides. Upon encountering bacteria, neutrophils phagocytose and kill them by production of reactive oxygen species. Abnormalities in any aspects of neutrophil development and/or function induce immunodeficiency or aberrant inflammatory reactions<sup>22</sup>. It has been shown that neutrophil number increases after short and long spaceflights<sup>5</sup> but neutrophils had less capacity to phagocyte pathogens<sup>23</sup>. A recent study showed that neutrophil to lymphocyte ratio increased when leukocytes from healthy human donors were exposed to  $\mu\text{G}$ <sup>24</sup>. This increase was also noted in 23 astronauts at the end of 6-month ISS expeditions<sup>24</sup> and in 20 healthy volunteers immediately post-bed rest exposure<sup>25</sup>, indicating an elevated level of inflammation.

**Monocytes.** Monocytes are present in blood and when entering tissues, differentiate into macrophages and myeloid dendritic cells (DCs). The monocyte number is relatively stable during a short spaceflight<sup>26</sup>, but could be increased during longer missions<sup>27</sup>. Thus, the effects on monocyte number seem dependent on mission's duration. Their function is affected as illustrated by reduced expression of CD62L and HLA-DR involved in migration and antigen presentation. Upon stimulation with lipopolysaccharides (LPS), monocytes from astronauts showed lower secretion of pro-inflammatory cytokines during the flight compared to before launch, thereby confirming the impairment of monocyte function<sup>26</sup>. Another study used the myelomonocytic human cell line U937 as a model for monocytes and showed that the expression of genes involved in monocytes and macrophage function (e.g., TAP2 and ABCC4) are impaired in  $\mu\text{G}$ <sup>28</sup>. Even if this cell line is a myelomonocytic cell line, it is mainly used to study the differentiation and function of macrophages that derive from monocytes thereby explaining why less data are available for monocytes compared to other cell types.

**Macrophages.** Macrophages phagocytose pathogens and present antigenic peptides to activate T cells. There are two main types of macrophages: the M1 type known as pro-inflammatory or classically activated macrophages, and the M2 type known as anti-inflammatory or alternatively activated macrophages. These two types have important roles in immunity but also in tissue homeostasis. Shi et al.<sup>29</sup> recently showed that  $\mu\text{G}$  and real microgravity ( $\mu\text{G}$ ) severely reduce the differentiation of macrophages from hematopoietic progenitors. These authors also showed that the polarization into M1 or M2 type are reduced because the RAS/ERK/NF $\kappa$ B pathway is downregulated under  $\mu\text{G}$  and  $\mu\text{G}$  conditions. These pathways are important for the differentiation of macrophages but also for their proliferation and function. A reduction of the proliferation of differentiated U937 cells under microgravity was also observed and could be explained by a downregulation of CDC25, a key factor for G2/M transition during cell cycle progression<sup>30</sup>. Another study conducted on a murine macrophage cell line showed a disruption of the cytoskeleton which is crucial for macrophage function<sup>31</sup>. In both M1 and M2 macrophages, an upregulation of beta-actin gene was shown. Additionally, these authors showed a reduction in secretion of the pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$  by M1 macrophages in  $\mu\text{G}$ . On the contrary, the production of reactive oxygen species by macrophages, used to degrade pathogens, was increased under spaceflight conditions, an observation that agrees with the higher inflammatory status noted above<sup>32</sup>. Tauber et al.<sup>33</sup> showed that a human M1 cell line present a decreased expression of CD14, important for the recognition of pathogens, as well as of ICAM-1, important for cellular adhesion and therefore cell function, under real space conditions. A recent comparison of genetically identical twins of which one spent 1 year at the ISS and the other remained at Earth<sup>34</sup> indicated elevated pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-1 $\alpha$  in-flight<sup>35</sup>. Post-landing single-cell analysis indicated a

progressive decrease in the M1 progenitor monocyte population and a progressive increase in M2 progenitor monocytes when compared to pre-flight data. This suggests that ISS exposure favors pro-inflammatory M1 type macrophage responses leading to prolonged inflammation. Taken together, these findings indicate that microgravity alters macrophage development and functions and may affect M1/M2 polarization.

**Natural killer cells.** Natural killer (NK) cells recognize and kill cancer and virus-infected cells via an immunological synapse and the release of vesicles containing cytotoxic proteins such as granzymes and perforin. NK cells secrete IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  that can activate the adaptive immune system. A reduction in the cytotoxic capacity of NK cells upon  $\mu\text{G}$  and  $\mu\text{G}$  has been reported<sup>36</sup>. While Mylabathula et al.<sup>37</sup> observed decreased cytotoxicity after 12 h of  $\mu\text{G}$ , Li et al.<sup>38</sup> reported that effects could be seen only after 48 h. Co-culture of blood-derived NK cells from ISS crew members with K562 leukemia target cells for 24 h showed no decrease in NK cell cytotoxic capacity<sup>39</sup>. Long-term exposure of NK cells to  $\mu\text{G}$  was assessed in blood samples from ISS crew members compared to ground control samples. Overall, a decrease in the cytotoxic capacity of NK cells towards target cell lines was reported. Interestingly, astronauts with longer exposure to  $\mu\text{G}$  showed a later onset of the reduction in cytotoxic activity indicating a possible adaptation to  $\mu\text{G}$  conditions<sup>36</sup>. Degranulation capacities of NK cells were investigated by assessing perforin and granzyme B levels. A reduction of perforin was observed in  $\mu\text{G}$ <sup>36</sup> but not in blood samples from ISS crew members<sup>36,39</sup>. Granzyme B production seemed not to be affected by  $\mu\text{G}$ . To assess whether the activating or inhibitory capacities of NK cells were altered by  $\mu\text{G}$ , cell surface receptors were measured. A reduction of both mRNA levels and cell surface expression of the activating receptor NKG2D and inhibitory receptor NKG2A<sup>36</sup> was observed in NK cells cultivated >24 h in  $\mu\text{G}$ , whereas <24 h culture showed similar expression to control NK cells. Furthermore, cell surface receptors of blood NK cells from astronauts were not affected by  $\mu\text{G}$  conditions<sup>36,39</sup>. Lastly, IFN $\gamma$  was reduced upon 12h<sup>39</sup> or >48h<sup>36</sup>  $\mu\text{G}$  culture, whereas TNF $\alpha$  only showed a reduction after 12h<sup>36</sup>. Possible countermeasures against reduced NK cell cytotoxicity upon  $\mu\text{G}$  were explored by Li et al.<sup>38</sup>. The addition of IL-15 but not IL-2 or IL-12 could rescue NK cell cytotoxicity towards K562 leukemia target cells. Moreover, these authors reported that NK cells in 1 G environment post  $\mu\text{G}$  exposure regained cytotoxic capacity. This was also detected in isolated NK cells from ISS crew member blood where cytotoxic capacities were regained after return to Earth<sup>36</sup>. Viral reactivation may be a threat during long-time space missions as varicella-zoster virus DNA was detected during and after spaceflight<sup>40–42</sup>. Some cases resulted in clinical disease manifestation of herpes zoster<sup>41</sup>. Furthermore, an exploratory RNA-seq analysis revealed vulnerability to viral infections during a 12-month period of isolation and confinement at the Concordia station<sup>43</sup>. More research on NK cells is needed as current studies show somehow contradictory results on cell surface marker expression, granulation, and cytokine secretion. Cytotoxic capacities of NK cells towards target cells are affected in both  $\mu\text{G}$  and  $\mu\text{G}$ , yet the mechanisms behind this remain to be explored.

**Dendritic cells.** DCs link innate sensing to adaptive immune responses. After sampling antigens in peripheral tissues, DCs mature and migrate to lymph nodes, where they initiate adaptive immune responses by presenting processed antigens in the context of Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules to T cells. DCs presenting antigenic peptides on MHC-I molecules activate CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells whereas antigen presentation on MHC-II molecules activate CD4<sup>+</sup> helper T cells<sup>44</sup>. Activation of DCs leads to increased cell surface expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 both of which bind to the co-



stimulatory receptor CD28 on T cells leading to T cell activation<sup>44</sup>. The importance of antigen presentation in immune responses place DC function in  $\mu$ G under scrutiny. The proliferation of DCs from isolated CD34<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> progenitor cells from human blood is reduced under  $\mu$ G<sup>45</sup>. This was associated with reduced expression of MHC-II molecules and CD80. These findings were also detected when murine JAWS II DCs were cultured in  $\mu$ G for 14 days, but not after 7 days of culture<sup>46</sup>. DCs isolated from murine spleen and bone marrow showed increased cell number after 16 h in  $\mu$ G<sup>47</sup>. These results suggest a time-dependent effect of  $\mu$ G on DCs. In blood isolated from an astronaut from the Eneide space mission, DCs generated using isolated monocyte precursors showed reduced MHC-II, CD80, and CD86 cell surface expression which was mirrored by gene expression of these markers. Moreover, gene expression of NF- $\kappa$ B, a transcription factor important for DC activation, was downregulated. These data indicate that DC maturation is reduced after spaceflight while DCs regained normality one-year post spaceflight<sup>48</sup>.  $\mu$ M do also impact maturation and cell surface marker expression of DCs<sup>46,48</sup>.

**T cells.** T cells are a major component of adaptive immunity and their roles include direct killing of infected host cells, regulation of immune responses *via* cytokine production, and activation of other immune cells. The earliest and essential step of T cell activation is the formation of an immune synapse requiring fine-tuned rearrangements of the cell cytoskeleton<sup>49</sup>. The immune synapse signals towards the nucleus to alter gene expression needed for T cell activation or differentiation into T cell subsets (i.e., T helper cells, T effector cells or T memory cells). In a series of important early studies, the cytoskeletal structures in cultured human cells were found altered in microgravity<sup>50–54</sup>. The actin cytoskeleton state and cytoskeleton-associated proteins was proposed as one of several possible cellular gravisensing systems<sup>49,55</sup>. A drawback of the earlier studies is that many cell biology experiments lacked adequate controls such as 1 G centrifuged control samples and proper experimental conditions (e.g., well-controlled temperature). More recently, alteration of the actin cytoskeleton of human cancer cells exposed to microgravity was demonstrated by life-cell imaging with a compact fluorescence microscope (FLUMIAS) during a parabolic flight<sup>56,57</sup>. The structures or mechanisms that act as ‘gravity responders’ in T cells are still unknown, however, inhibition of lymphocyte proliferation in microgravity is due to alterations occurring within the first hours of exposure to microgravity<sup>58</sup>. Microarray expression analysis revealed altered cytoskeletal gene expression<sup>59</sup> and overall altered patterns of global gene expression in space-flown human T cells when compared to T cells activated in 1 G during spaceflight<sup>60</sup>. Particularly, impaired induction of early genes, regulated by transcription factors NF- $\kappa$ B, CREB, ELK, AP-1, and STAT as well as HIF-1 $\alpha$  and hypoxia-inducible transcripts contributed to T cell inhibition in modeled low gravity<sup>57,60,61</sup>. Analysis of gene expression in T cells from four human donors on board the ISS identified 99 downregulated genes in microgravity<sup>60</sup>. In the context of cytoskeletal regulation, it was especially interesting that a majority of the genes downregulated in T cells exposed to microgravity contained DNA serum response elements (SRE) in the promoters that binds serum response factor (SRF), a direct regulator of cytoskeletal genes<sup>60</sup>. In the NASA twin study, T cells showed the highest number of differently expressed genes, even after the return to Earth<sup>34</sup>. The lymphocyte response towards mitogens in astronauts and cosmonauts is reduced after spaceflight. Human T cells stimulated with the mitogen concanavalin A (ConA) reveal considerably reduced *in vitro* activation and cell proliferation in microgravity<sup>49</sup>, on a sounding rocket flight<sup>62,63</sup>, and in a rotary bioreactor system<sup>64</sup>. The study of microgravity effects on cultured human T cells on a sounding rocket flight showed that binding of ConA to T cells was not influenced by microgravity, whereas patching of the ConA receptors, a process

that involves the actin cytoskeleton to reorganize highly ordered membrane structures, was significantly lower<sup>52</sup>. T cells, pre-exposed to microgravity and stimulated with ConA, show decreased expression of activation receptors including CD25, CD69, and CD71, and reduced inflammatory cytokine secretion and cell proliferation when compared to control T cells exposed to 1 G gravity<sup>64</sup>. Moreover, human lymphocytes undergo apoptosis upon exposure to modeled low gravity<sup>65</sup>. Together, T cells in  $\mu$ G show marked changes in gene expression and cytoskeletal rearrangement, and further studies are needed to understand the long-term effect of real and  $\mu$ G on T cell differentiation and T cell responses.

**B cells.** B cells are responsible of humoral immunity. B cells express highly specific and highly diversified receptors, known as immunoglobulins (Ig), or antibodies, that directly bind and neutralize pathogens and toxins. The breadth of the Ig repertoire sets the humoral response and therefore, any alteration in the Ig repertoire may lead to immune dysregulation. No change in the number of human B cells was reported during a 6 months stay on the ISS<sup>66,67</sup> or after 2 months of bed rest<sup>68</sup>. The analysis of the Ig repertoire of mice flown aboard the ISS for a short period of time (21–22 days) indicated that this repertoire was similar between ground control and flight animals<sup>69</sup>. However, Bucheim et al. reported that the IgM repertoire of two out of five healthy cosmonauts who stayed 6 months on the ISS was affected<sup>67</sup>. These modifications of the IgM repertoire persisted up to 30 days after landing. Only marginal changes were observed in the levels of soluble biomarkers of B cell homeostasis, i.e., IgG and IgM levels after 6 months spaceflights measured in the blood of 23 astronauts<sup>66</sup>. To address the B cell response upon infection, researchers have immunized an amphibian animal model<sup>14</sup>, *Pleurodeles waltl*, during a long-term spaceflight (5 months). Analyses of these animals highlighted that the antibody production as well as the somatic hypermutation rate, which diversify antibody binding sites to increase its affinity for the antigen, is affected<sup>70–72</sup>. Recent studies of immunized AOS mice also showed changes in the usage of antibody gene segments<sup>73</sup>. All of these findings indicate that spaceflight can alter the humoral immune response and modify the antibody repertoire but further researches are required to precise the impact of spaceflight on humoral immunity.

## IDENTIFIED KEY KNOWLEDGE GAPS

The white paper for the immune system identified six major knowledge gaps.

### Integration of immune system data

Determination of how the different immune cells respond and adapt to long-term exposure to microgravity, ionizing radiation, and psychological stress (>1 year) in a significant number of subjects is of vast importance. Understanding immune suppression (low response to infections) versus hyperinflammation, allergy, cancer, and autoimmunity (often also associated with low response to infections) will be important to develop common and tailored, and precise countermeasures. The latter is important since there may be large variations between individuals in their immune responses<sup>74</sup>. Moreover, this research will increase our understanding of the adaptation of the immune system to Space and Earth conditions. These aspects have a wider societal interest, as they could lead to a better understanding of the role of these extreme stress factors in the pathogenesis and pathophysiology of various diseases in our societies which will have to face important climate changes in the near future.



### Contamination, dust, infection, vaccination, autoimmunity

Dust within space vehicles could provoke skin, eye, and other irritations for the astronauts. These are closely connected to allergy and infection, and should be further addressed for long-term missions. Infection and irritation through contamination from microbial or Lunar/Martian material and from microbes in the space habitat is also of relevance. A better understanding of microbiome changes on the immune system should be further evaluated. Indeed, some bacteria can be more resistant to antibiotics<sup>75</sup> and can increase their virulence when exposed to space conditions<sup>76,77</sup>. Antibiotics may be used during an infection on board a space vehicle. However, an increased antibiotic resistance of bacteria combined with a decrease of antibiotic efficiency, through a change in their pharmacodynamics in space can be experienced<sup>78</sup>. Moreover, microgravity has been shown to promote biofilm formation<sup>76,78,79</sup> through which bacteria grow and stick to each other. Biofilms are known not only to increase antibacterial resistance among bacteria but also their ability to infect. The dissemination of antibiotic resistance gene-carrying plasmids among bacteria in gut microbiota is another event that could be affected by stress<sup>79</sup>. Vaccination of astronauts against potential pathogens before and possibly revaccination during spaceflights should be considered to maximize the prevention of infectious diseases<sup>67</sup> (Fig. 1). There is currently no clear evidence that spaceflight may be associated with a risk of developing autoimmune diseases. However, this possibility should not be neglected because several observations suggest that this type of problem could potentially occur. Indeed, murine medullary thymic epithelial cells (mTECs) were shown to be reduced after 14 days of hindlimb unloading<sup>80</sup>. mTECs express tissue-specific antigens and are critical for removing self-reactive T cells<sup>81</sup>. A model mimicking socioenvironmental stressors encountered during space missions suggested an increase in the self-reactivity of the murine TCR $\beta$  repertoire<sup>21</sup>. A decrease in human T helper 1 cell cytokine expression was noted postflight<sup>82</sup> suggesting a potential T helper 2 cytokine shift that represents a risk for T helper 2 related autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. In the same way, an increase in human platelet to lymphocyte ratio was observed after two months of head-down tilt bed rest<sup>25</sup>. Such increase was shown to correlate with disease activity of systemic lupus erythematosus<sup>83</sup>. Finally, changes in the antibody repertoire of two out of five analyzed cosmonauts were observed during flight and up to 30 days after landing<sup>67</sup>.

### Cancer, radiation, virus reactivation

Cancer is caused by an accumulation of genetic mutations and can be acquired through chronic exposure to environmental stressors as encountered during long-term space missions. Cosmic radiation has been identified as a main threat for cancer development during long-term space missions<sup>2</sup>. Cancer may also develop when the immune system is compromised affecting both anti-tumor responses mediated by NK and T cells and controlled proliferation of immune cells, leading to leukemia and lymphoma. Identifying mechanisms of cancer development and progression during spaceflights is crucial. Since the impairment of immune system activity is crucial for cancer progression, and a healthy immune system can counteract tumor growth, it is considered as very important to elucidate how microgravity may affect the existing balance between immunity and immune escape mechanisms in cancer. Moreover, the role played by cancer microenvironment, namely the stromal components and the extracellular matrix, needs further investigation. Finally, reactivation of latent viruses such as Epstein Barr virus and cytomegalovirus is a threat, especially in a setting of compromised immune cells, and therefore should be carefully monitored during long-term space missions. Metha *et al* analyzed saliva and urine samples for

Epstein-Barr virus, varicella-zoster virus, herpes simplex virus type 1, and cytomegalovirus and identified virus shedding in 8 of 23 ISS crew members<sup>84</sup>. This data emphasize the importance of careful monitoring of crew members for immune system alterations, and reactivation of latent viruses will serve as a critical readout for intervention using countermeasures.

### Individual factors, precision medicine, and countermeasures

Investigating the molecular mechanisms behind why and how individuals respond differently genetically as well as epigenetically to space stressors has been pointed out as of high importance. This issue is relevant to develop a better understanding of human adaptation to spaceflight and could also potentially be of interest to consider in the future selection of astronauts and crew composition for long space exploration missions. Indeed, personal response, stress management, and operational improvements will have a direct impact on the general immune response of the astronauts as highlighted in a recent review<sup>85,86</sup>. While it is challenged by ethical issues, genetic predisposition seems to be a topic of increasing interest. Precision medicine is highly applicable for individual treatment strategies and countermeasures on Earth and could be beneficial to be tailored to each astronaut. The development of predictive biomarkers of immune sensitivity should be identified, implemented, and regularly monitored during long-term space missions. These potential biomarkers could for example include quantification of cytokines and neutrophil/lymphocyte ratio to monitor inflammation status<sup>24</sup>, and viral reactivation as a biomarker of spaceflight-induced alteration of cell-mediated immunity<sup>40,87,88</sup> (Fig. 2).

### Omics approaches to study the immune system

Recent integration of currently available Omics data from astronauts at ISS with low number of individuals and larger number of data sets from animal and cell-based models in space and at ground-based facilities have revealed similarities and differences when comparing human versus model systems and space versus Earth<sup>34,89</sup>. This multiomics approach identified significant enrichment for mitochondrial processes, innate immunity, and chronic inflammation<sup>89</sup>. Including comparison to the NASA twin study, mitochondrial stress is a consistent phenotype of spaceflight and highly relevant for immune cells. It will also be important to increase knowledge of alterations in RNA transcription and translation (transcriptomics) as well as epigenetic patterns for gene regulation in the various types of immune cells, immune cell repertoire analysis, proteins (proteomics), and metabolites (immune cell metabolomics). Finally, it will be necessary to look for correlations with Omics data deduced from other systems, as the immune system interacts with and may be regulated by many other systems.

### Technology development

Monitoring of the immune system during short- and long-term space missions has been identified as a key knowledge gap and is tightly linked to the development of new technologies (Fig. 2). Space analog researches and ground-based facilities have proven to be valuable for the prediction of specific aspects of the immune system that will be useful to monitor. These techniques include flow cytometry, sample preparation and storage for Omics analysis, sampling approaches (blood, saliva, urine, feces), microscopy (low and high resolution), artificial intelligence/machine learning, and realtime PCR analysis for gene expression<sup>90</sup>. In this context, it is to note, for example, that a recent study showed that genotoxic stress in humans can be monitored by quantifying the amount of DNA double-strand breaks in lymphocytes from a simple finger prick upon exposure to galactic cosmic ray components<sup>91</sup>.



	Already available and used in space	Already available on Earth and used in space	Potential future therapy to be further investigated
<b>Prevention</b>		Preparation for stem cell or bone marrow transplantation	Inflight vaccination
<b>Technological development for diagnosis in space</b>	Artificial intelligence tools for immune monitoring		Inflight vaccination
	Erythrocytes, platelets quick measurement in a drop of blood	Flow cytometer for immune monitoring and cytokine measurements	Preparation for artificial blood transfusion
	Detection of inflammatory and stress saliva and urine		Fecal monitoring (for quick check for inflammation and dysbiosis)
<b>Countermeasures available for use in space</b>	Measures for skin cleaning and hygiene to avoid irritation	Corticosteroids	Revaccination
	Physical exercise	Growth factors for stimulating blood cell production	Stem cell or bone marrow transplantation
	Stress and sleep management		Artificial gravity, low body gravity, pressure, thigh cuffs
	Intravenous immunoglobulins, serotherapy		Inhibitors of cytokine storms, autoimmune disease
	Food supplements		Probiotics cocktail to help boost immunity
<b>Potential futures areas</b>		Antimutagenic keepers of genomic integrity	Immunotherapy for cancer treatment
		Radioprotectants of the immune system	Targeted irradiation for cancer treatments
			Fecal transplantation

**Fig. 2 Current and future immune-related countermeasures in space.** Prevention, technological development for inflight diagnosis, countermeasures available for use in space, and potential future countermeasures. The green background indicates those already available and used in space, the yellow background those that are not yet used in space, and the red background points out potential future therapy to be further investigated.

### IDENTIFIED PRIORITIES FOR THE SPACE PROGRAM: RECOMMENDATIONS IN SHORT, MIDDLE, AND LONG-TERM

Four main recommendations emerged from the consulted space scientific community in Immunology to help addressing identified key knowledge gaps.

#### Recommendation 1: standardization of methods for immunity-related experiment design, performance, and analyses

To better understand immune changes, there is an emerging need to combine analysis of immune cells from ground-based and space platforms, and also across species where possible. Ground-based platforms have the advantage of isolating one parameter to study, for example altered gravity or ionizing radiation, and to perform quantitative analysis of a large number of samples and conditions. Space-based platforms have the advantage of exposing samples to real space conditions, but is often limited to qualitative analysis of a limited amount of samples. Therefore, there is a need to continue to use and develop ground-based and space platforms for the analysis of immune cells and immune system adaptation/alteration. Standardization of culture conditions (cytokine, growth factor, antibody stimulation), flow cytometry-based parameters, and bioinformatics analysis for Omics data is urgently needed to allow efficient comparisons between studies thereby facilitating the discovery of mechanisms underlying observed changes. It is also recommended that the

raw data files for analysis are made publically available to the scientific community in a comparable and usable form.

#### Recommendation 2: set up a database of results from ground and space-based integrative human research

A data management and distribution system should be established in coordination with major European stakeholders, ESA and EC, to make these data freely accessible to the scientific community. Protocols should be established for disclosure of anonymous crew health data, retrospectively and prospectively, to qualified researchers. Maximum exploitation of currently available resources on Earth (ESA ground-based facilities) and in space, as well as respective databases is mandatory. Examination of these data will provide the basis for a critical, high-quality health care for crews in orbit and will yield solutions for medical challenges for long-term spaceflights. This shared database would provide the basis for well-conceived and evidence-based decisions to physiological concerns as well as for the development of a new generation of integrated countermeasures. NASA GeneLab is the first comprehensive space Omics database that aims to optimize scientific return from spaceflight and ground simulation experiments funded by multiple space agencies around the world<sup>92</sup>. ISSOP (International Standards for SpaceOmics Processing) has been founded as an international consortium of scientists to enhance guidelines for Omics analysis between space biologists globally including European researchers<sup>93</sup>. While ESA does not yet have its own sample-sharing schemes, it encourages multinational



spaceflight experiments with sample-sharing between European researchers and around the world.

### Recommendation 3: develop new tools to monitor the immune system

Monitoring of the immune system and immune cells has been identified as a key knowledge gap and is tightly linked to the development of new technologies for detailed analysis and monitoring of astronauts during long-term space missions. Space analog research and ground-based facilities have proven to be valuable for the prediction of specific aspects of the immune system that will be useful to monitor and therefore should be further implemented in this effort. There is currently minimal clinical laboratory equipment at ISS and therefore, devices that measure white blood cells will be useful for monitoring the immune health of the astronauts. A commercial blood analyzer ('Hemocue' WBC/diff, Sweden) for fingerstick blood sample has been tested and initial analysis suggests that it functions well in microgravity and at ISS<sup>94</sup>. Quantifying only cells in blood samples may not suffice; more sophisticated analyses will likely be needed. These methods and techniques should be developed to monitor the differentiation and developmental stages of immune cells, and also include analysis of the expanding number of subtypes within one immune cell population. For B and T cells, analysis of the Ig and T cell receptor (TCR) repertoire may provide much more in depth information compared to only the number of cells. Individual measurements over time versus common variations among astronauts, cells, and animal models would be important. It will be important to identify immune "signaling hubs" that can be targeted for development and administration of biological countermeasures.

### Recommendation 4: Integrate the analysis of the immune system with other organs and tissues to preserve the health of the next generation of astronauts

To plan long-lasting deep-space missions, the effects on the immune system and its links with the skin, bone, lungs, microbiome, and cancer following altered gravity and space radiation exposure should be further explored in both humans and animal models. This will require an integrated view by a thorough analysis of the molecular and cellular processes leading to these dysregulations, the sharing of data between specialists in these tissues, and the development of more interdisciplinary projects. Indeed, long-duration space exploration missions might reduce the organism's ability to respond to injuries, infections, and predispose astronauts to the onset of chronic diseases such as immunosuppression, cardiovascular and metabolic diseases, gut dysbiosis, cancer, and premature aging by strongly influencing redox and metabolic processes, microbiota, immune function, endotoxin, and pro-inflammatory signal production. Furthermore, it is known that low-grade chronic inflammation involves many of the above mechanisms and is a distinctive feature of major chronic diseases. Better knowledge on this topic is therefore needed to manage a number of diseases both in space and on Earth.

### TERRESTRIAL BENEFITS AND APPLICATIONS

Understanding stressor-related immune challenges in space is highly relevant to the understanding of the biology of cancer immunology, the balance of inflammation and endogenous mechanisms to control it, and the lack of control (autoimmunity/allergies) in the young and ageing population on Earth. Indeed, the abnormal physiology that manifests in healthy humans during their adaptation to space has all the characteristics of accelerated ageing<sup>95</sup>, an observation confirmed in AOS mice<sup>16</sup>. Furthermore, as stressors are omnipresent in our societies which will have to face important climate changes in a near future, this

knowledge could contribute to a better understanding of its role in the pathogenesis and pathophysiology of various diseases. Indeed, the functions of the immune system can be affected in response to environmental/living conditions, and chronic and acute stress conditions can result in a further parallel interaction between the immune system and other organ systems. As an example, stressors cause neurophysiologic responses and hormone liberation which can modulate inflammation but also promote bone resorption.

Finally, while the development of personalized medicine, remote controlled flow cytometry and microscopes, biosensors that can measure drug concentration or other biomarkers in minute volumes of blood (or other biological fluids) as well as artificial intelligence/machine learning would be favorable for medical analyses in space, it can also prove valuable at the patient bed site, especially in a medical desert.

### OUTLOOK AND SUMMARY

A key knowledge gap identified in the process of writing the ESA white paper is the lack of integrating the immune system with other systems such as the musculoskeletal, pulmonary, brain, gut, and cardiovascular systems as well as the close proximity of the immune system with nutrition, metabolism, radiation, and microbes. Therefore, a closer collaboration between researchers involved in space physiology would be desirable to fully understand the physiology of crew members during deep spaceflight. Serious illness of astronauts is so far rare but need to be carefully monitored in preparation for deep-space exploration missions. A recent initiative has suggested a specific immunologic countermeasure protocol for deep-space exploration missions<sup>96</sup>. Importantly, this initiative was focused on precision countermeasures considering the accumulated recent data by integrative analysis of data from different space analogs and samples from ISS crew members. For monitoring the immune system function, cytokines measured in a drop of blood and reactivation of viruses can be measured already. For more complex monitoring of the immune system, technical development of methods is an immediate need. For deep-space exploration, a pre-mission personalized countermeasure protocol should be developed for each crew member and exposure to ground-based facilities will serve an important role in development of such regimen.

Received: 16 June 2022; Accepted: 15 June 2023;  
Published online: 28 June 2023

### REFERENCES

1. Baran, R. et al. The cardiovascular system in space: focus on in vivo and in vitro studies. *Biomedicine* **10**, 59 (2021).
2. Cortese, F. et al. Vive la radiorésistance!: converging research in radiobiology and biogerontology to enhance human radioresistance for deep space exploration and colonization. *Oncotarget* **9**, 14692–14722 (2018).
3. Crucian, B. E. et al. Immune system dysregulation during spaceflight: potential countermeasures for deep space exploration missions. *Front. Immunol.* **9**, 1437 (2018).
4. Akiyama, T. et al. How does spaceflight affect the acquired immune system? *NPJ Microgravity* **6**, 14 (2020).
5. Guéguinou, N. et al. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1027–1038 (2009).
6. Fernandez-Gonzalo, R., Baatout, S. & Moreels, M. Impact of particle irradiation on the immune system: from the clinic to mars. *Front. Immunol.* **8**, 177 (2017).
7. Radstake, W. E., Baselet, B., Baatout, S. & Verslegers, M. Spaceflight stressors and skin health. *Biomedicine* **10**, 364 (2022).
8. Belkaid, Y. & Tamoutounour, S. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 353–366 (2016).



9. Rooks, M. G. & Garrett, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 341–352 (2016).
10. Dunn, C. D., Johnson, P. C., Lange, R. D., Perez, L. & Nessel, R. Regulation of hematopoiesis in rats exposed to antiorthostatic, hypokinetic/hypodynamia: I. model description. *Aviat. Space Environ. Med.* **56**, 419–426 (1985).
11. Ichiki, A. T. et al. Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 37–43 (1996).
12. Sotnezova, E. V., Markina, E. A., Andreeva, E. R. & Buravkova, L. B. Myeloid precursors in the bone marrow of mice after a 30-day space mission on a Bion-M1 biosatellite. *Bull. Exp. Biol. Med.* **162**, 496–500 (2017).
13. Davis, T. A. et al. Effect of spaceflight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myelopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 69–76 (1996).
14. Fripiat, J.-P. Contribution of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* to the analysis of spaceflight-associated immune system deregulation. *Mol. Immunol.* **56**, 434–441 (2013).
15. Huin-Schohn, C. et al. Gravity changes during animal development affect IgM heavy-chain transcription and probably lymphopoiesis. *FASEB J.* **27**, 333–341 (2013).
16. Lescale, C. et al. Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. *FASEB J.* **29**, 455–463 (2015).
17. Tascher, G. et al. Analysis of femurs from mice embarked on board BION-M1 biosatellite reveals a decrease in immune cell development, including B cells, after 1 wk of recovery on Earth. *FASEB J.* **33**, 3772–3783 (2019).
18. Woods, C. C., Banks, K. E., Gruener, R. & DeLuca, D. Loss of T cell precursors after spaceflight and exposure to vector-averaged gravity. *FASEB J.* **17**, 1526–1528 (2003).
19. Benjamin, C. L. et al. Decreases in thymopoiesis of astronauts returning from space flight. *JCI Insight.* **1**, e88787 (2016).
20. Ghislin, S., Ouzren-Zarhloul, N., Kaminski, S. & Fripiat, J.-P. Hypergravity exposure during gestation modifies the TCR $\beta$  repertoire of newborn mice. *Sci. Rep.* **5**, 9318 (2015).
21. Fonte, C. et al. Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR- $\beta$  repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB J.* **33**, 896–908 (2019).
22. Keszei, M. & Westerberg, L. S. Congenital defects in neutrophil dynamics. *J. Immunol. Res.* **2014**, 303782 (2014).
23. Kaur, I., Simons, E. R., Castro, V. A., Mark Ott, C. & Pierson, D. L. Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain. Behav. Immun.* **18**, 443–450 (2004).
24. Paul, A. M. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio: a biomarker to monitor the immune status of astronauts. *Front. Immunol.* **11**, 564950 (2020).
25. Jacob, P., Bonnefoy, J., Ghislin, S. & Fripiat, J.-P. Long-duration head-down tilt bed rest confirms the relevance of the neutrophil to lymphocyte ratio and suggests coupling it with the platelet to lymphocyte ratio to monitor the immune health of astronauts. *Front. Immunol.* **13**, 952928 (2022).
26. Crucian, B., Stowe, R., Quiariarte, H., Pierson, D. & Sams, C. Monocyte phenotype and cytokine production profiles are dysregulated by short-duration spaceflight. *Aviat. Space Environ. Med.* **82**, 857–862 (2011).
27. Buchheim, J.-I. et al. Stress related shift toward inflammaging in cosmonauts after long-duration space flight. *Front. Physiol.* **10**, 85 (2019).
28. Thiel, C. S. et al. Identification of reference genes in human myelomonocytic cells for gene expression studies in altered gravity. *BioMed. Res. Int.* **2015**, 363575 (2015).
29. Shi, L. et al. Spaceflight and simulated microgravity suppresses macrophage development via altered RAS/ERK/NF $\kappa$ B and metabolic pathways. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 1489–1502 (2021).
30. Maier, J. A. M. Impact of simulated microgravity on cell cycle control and cytokine release by U937 cells. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **19**, 279–286 (2006).
31. Ludtka, C., Moore, E. & Allen, J. B. The effects of simulated microgravity on macrophage phenotype. *Biomedicines* **9**, 1205 (2021).
32. Thiel, C. S. et al. Rapid adaptation to microgravity in mammalian macrophage cells. *Sci. Rep.* **7**, 43 (2017).
33. Tauber, S. et al. Cytoskeletal stability and metabolic alterations in primary human macrophages in long-term microgravity. *PLoS One* **12**, e0175599 (2017).
34. Garrett-Bakelman, F. E. et al. The NASA twins study: a multidimensional analysis of a year-long human spaceflight. *Science* **364**, eaau8650 (2019).
35. Gertz, M. L. et al. Multi-omic, single-cell, and biochemical profiles of astronauts guide pharmacological strategies for returning to gravity. *Cell Rep.* **33**, 108429 (2020).
36. Bigley, A. B. et al. NK cell function is impaired during long-duration spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **126**, 842–853 (2019).
37. Mylabathula, P. L. et al. Simulated microgravity disarms human NK-cells and inhibits anti-tumor cytotoxicity in vitro. *Acta Astronaut.* **174**, 32–40 (2020).
38. Li, Q. et al. Effects of simulated microgravity on primary human NK cells. *Astrobiology* **13**, 703–714 (2013).
39. Buravkova, L. B., Rykova, M. P., Grigorieva, V. & Antropova, E. N. Cell interactions in microgravity: cytotoxic effects of natural killer cells in vitro. *J. Gravit. Physiol.* **11**, P177–P180 (2004).
40. Cohrs, R. J., Mehta, S. K., Schmid, D. S., Gilden, D. H. & Pierson, D. L. Asymptomatic reactivation and shed of infectious varicella zoster virus in astronauts. *J. Med. Virol.* **80**, 1116–1122 (2008).
41. Mehta, S. K. et al. Stress-induced subclinical reactivation of varicella zoster virus in astronauts. *J. Med. Virol.* **72**, 174–179 (2004).
42. Rooney, B. V., Crucian, B. E., Pierson, D. L., Laudenslager, M. L. & Mehta, S. K. Herpes virus reactivation in astronauts during spaceflight and its application on earth. *Front. Microbiol.* **10**, 16 (2019).
43. Buchheim, J.-I. et al. Exploratory RNA-seq analysis in healthy subjects reveals vulnerability to viral infections during a 12-month period of isolation and confinement. *Brain Behav. Immun. Health* **9**, 100145 (2020).
44. Wculek, S. K. et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 7–24 (2020).
45. Savary, C. A. et al. Characteristics of human dendritic cells generated in a microgravity analog culture system. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim.* **37**, 216–222 (2001).
46. Tackett, N. et al. Prolonged exposure to simulated microgravity diminishes dendritic cell immunogenicity. *Sci. Rep.* **9**, 13825 (2019).
47. Chen, H. et al. The distinctive sensitivity to microgravity of immune cell subpopulations. *Microgravity Sci. Technol.* **27**, 427–436 (2015).
48. Monici, M. et al. Does the exposure to microgravity affect dendritic cell maturation from monocytes? *Microgravity Sci. Technol.* **19**, 187–190 (2007).
49. Ullrich, O. & Thiel, C. S. Gravitational force: triggered stress in cells of the immune system. In: *Stress Challenges and Immunity in Space* (ed. Chouker, A.) 187–202 (Springer Berlin Heidelberg, 2012). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22272-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22272-6_14).
50. Cogoli, A. Hematological and immunological changes during space flight. *Acta Astronaut.* **8**, 995–1002 (1981).
51. Cogoli, A. et al. Mitogenic signal transduction in T lymphocytes in microgravity. *J. Leukoc. Biol.* **53**, 569–575 (1993).
52. Cogoli, A. & Cogoli-Greuter, M. Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity. *Adv. Space Biol. Med.* **6**, 33–79 (1997).
53. Lewis, M. L. et al. Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J.* **12**, 1007–1018 (1998).
54. Hughes-Fulford, M. Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. *Adv. Space Res.* **32**, 1585–1593 (2003).
55. Häder, D.-P., Braun, M., Grimm, D. & Hemmersbach, R. Gravitoreceptors in eukaryotes—a comparison of case studies on the cellular level. *NPJ Microgravity* **3**, 13 (2017).
56. Corydon, T. J. et al. Alterations of the cytoskeleton in human cells in space proved by life-cell imaging. *Sci. Rep.* **6**, 20043 (2016).
57. Vogel, J. et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and genes of related pathways in altered gravity. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E436 (2019).
58. Hashemi, B. B. et al. T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and in spaceflight. *FASEB J.* **13**, 2071–2082 (1999).
59. Lewis, M. L. et al. cDNA microarray reveals altered cytoskeletal gene expression in space-flight leukemic T lymphocytes (Jurkat). *FASEB J.* **15**, 1783–1785 (2001).
60. Chang, T. T. et al. The Rel/NF- $\kappa$ B pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 1133–1145 (2012).
61. Boonyaratankornkit, J. B. et al. Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J.* **19**, 2020–2022 (2005).
62. Pippia, P., Meloni, M. A., Cossu, G., Cogoli-Greuter, M. & Cogoli, A. Cellular adhesion in neoplastic and syngeneic normal cells under altered gravitational conditions. *J. Gravit. Physiol.* **5**, P165–P166 (1998).
63. Schwarzenberg, M. et al. Microgravity simulations with human lymphocytes in the free fall machine and in the random positioning machine. *J. Gravit. Physiol.* **5**, P23–P26 (1998).
64. Luo, H., Wang, C., Feng, M. & Zhao, Y. Microgravity inhibits resting T cell immunity in an exposure time-dependent manner. *Int. J. Med. Sci.* **11**, 87–96 (2014).
65. Maccarrone, M. et al. Creating conditions similar to those that occur during exposure of cells to microgravity induces apoptosis in human lymphocytes by 5-lipoxygenase-mediated mitochondrial uncoupling and cytochrome c release. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 472–481 (2003).
66. Spielmann, G. et al. B cell homeostasis is maintained during long-duration spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **126**, 469–476 (2019).
67. Buchheim, J.-I. et al. Plasticity of the human IgM repertoire in response to long-term spaceflight. *FASEB J.* **34**, 16144–16162 (2020).
68. Bonnefoy, J. et al. B-cell homeostasis is maintained during two months of head-down tilt bed rest with or without antioxidant supplementation. *Front. Immunol.* **13**, 830662 (2022).
69. Ward, C. et al. Effects of spaceflight on the immunoglobulin repertoire of unimmunized C57BL/6 mice. *Life Sci. Space Res.* **16**, 63–75 (2018).
70. Boxio, R., Dournon, C. & Fripiat, J.-P. Effects of a long-term spaceflight on immunoglobulin heavy chains of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **98**, 905–910 (2005).



71. Bascove, M., Huin-Schohn, C., Guéguinou, N., Tschirhart, E. & Fripiat, J.-P. Spaceflight-associated changes in immunoglobulin VH gene expression in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *FASEB J.* **23**, 1607–1615 (2009).
72. Bascove, M., Guéguinou, N., Schaerlinger, B., Gauquelin-Koch, G. & Fripiat, J.-P. Decrease in antibody somatic hypermutation frequency under extreme, extended spaceflight conditions. *FASEB J.* **25**, 2947–2955 (2011).
73. Rettig, T. A., Nishiyama, N. C., Pecaut, M. J. & Chapes, S. K. Effects of skeletal unloading on the bone marrow antibody repertoire of tetanus toxoid and/or CpG treated C57BL/6J mice. *Life Sci. Space Res.* **22**, 16–28 (2019).
74. Brodin, P. et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* **160**, 37–47 (2015).
75. Juergensmeyer, M. A., Juergensmeyer, E. A. & Guikema, J. A. Long-term exposure to spaceflight conditions affects bacterial response to antibiotics. *Microgravity Sci. Technol.* **12**, 41–47 (1999).
76. Rosenzweig, J. A., Ahmed, S., Eunson, J. & Chopra, A. K. Low-shear force associated with modeled microgravity and spaceflight does not similarly impact the virulence of notable bacterial pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 8797–8807 (2014).
77. Cervantes, J. L. & Hong, B.-Y. Dysbiosis and immune dysregulation in outer space. *Int. Rev. Immunol.* **35**, 67–82 (2016).
78. Graebe, A., Schuck, E. L., Lensing, P., Putcha, L. & Derendorf, H. Physiological, pharmacokinetic, and pharmacodynamic changes in space. *J. Clin. Pharmacol.* **44**, 837–853 (2004).
79. Peterson, G., Kumar, A., Gart, E. & Narayanan, S. Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. *Microb. Pathog.* **51**, 1–8 (2011).
80. Horie, K. et al. Long-term hindlimb unloading causes a preferential reduction of medullary thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator (Aire). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **501**, 745–750 (2018).
81. Abramson, J. & Anderson, G. Thymic epithelial cells. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 85–118 (2017).
82. Crucian, B. E., Stowe, R. P., Pierson, D. L. & Sams, C. F. Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviat. Space Environ. Med.* **79**, 835–843 (2008).
83. Wu, Y., Chen, Y., Yang, X., Chen, L. & Yang, Y. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) were associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Int. Immunopharmacol.* **36**, 94–99 (2016).
84. Mehta, S. K. et al. Latent virus reactivation in astronauts on the international space station. *NPJ Microgravity* **3**, 11 (2017).
85. Crucian, B. E. et al. Countermeasures-based improvements in stress, immune system dysregulation and latent herpesvirus reactivation onboard the international space station - relevance for deep space missions and terrestrial medicine. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **115**, 68–76 (2020).
86. Pavez Lorié, E. et al. The future of personalized medicine in space: from observations to countermeasures. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 739747 (2021).
87. Mehta, S. K., Stowe, R. P., Feiveson, A. H., Tyring, S. K. & Pierson, D. L. Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. *J. Infect. Dis.* **182**, 1761–1764 (2000).
88. Pierson, D. L., Stowe, R. P., Phillips, T. M., Lugg, D. J. & Mehta, S. K. Epstein-Barr virus shedding by astronauts during space flight. *Brain. Behav. Immun.* **19**, 235–242 (2005).
89. da Silveira, W. A. et al. Comprehensive multi-omics analysis reveals mitochondrial stress as a central biological hub for spaceflight impact. *Cell* **183**, 1185–1201.e20 (2020).
90. Fripiat, J.-P. Space Exploration and Travel, Future Technologies for Inflight Monitoring and Diagnostic. In: *Global Virology III: Virology in the 21st Century* eds. Shapshak, P. et al. 471–484 (Springer International Publishing, 2019).
91. Pariset, E. et al. DNA damage baseline predicts resilience to space radiation and radiotherapy. *Cell Rep.* **33**, 108434 (2020).
92. Ray, S. et al. GeneLab: omics database for spaceflight experiments. *Bioinformatics* **35**, 1753–1759 (2019).
93. Rutter, L. et al. A new era for space life science: international standards for space omics processing. *Patterns* **1**, 100148 (2020).
94. Crucian, B. et al. Spaceflight validation of technology for point-of-care monitoring of peripheral blood WBC and differential in astronauts during space missions. *Life Sci. Space Res.* **31**, 29–33 (2021).
95. Vernikos, J. & Schneider, V. S. Space, gravity and the physiology of aging: parallel or convergent disciplines? A mini-review. *Gerontology* **56**, 157–166 (2010).
96. Makedonas, G. et al. Specific immunologic countermeasure protocol for deep-space exploration missions. *Front. Immunol.* **10**, 2407 (2019).

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the European Space Agency (ESA), the French Space Agency (CNES), ESA/BELSPPO, and the Swedish National Space Agency (SNSA) for their support. B. Baselet is supported by ESA/BELSPPO/Prodex, IMPULSE contract CO-90-11-2801-04. P. Jacob is supported by the French Ministry of Higher Education and Research. The authors S.B. and J.P.F. are members of the European Space Agency's "Topical Team Stress Challenges and Immunity in Space" and thank all members, associates, and international participants who have helped evolve this field with inputs and discussions since 2008 that cannot be reflected or attributed individually due to given limitations. The authors wish to acknowledge the enabling support for the Topical Team by the European Space Agency (ESA) under the ELIPS 3, ELIPS 4, and SciSpacE program (contract 21183/07/NL/VJ provided to Alexander Choukér at the Hospital of the University of Munich, Germany).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.J., C.O., and B.B.: literature research, main writing of the manuscript & figure design. L.S.W., J.-P.F., and S.B.: financial support, the original concept of the manuscript, management of the writing, manuscript layout, design & ideas, interpretation of literature, manuscript reviewing and editing.

## COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Sarah Baatout.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023





## **Impact de conditions environnementales extrêmes sur les répertoires d'anticorps murins et humains et définition de nouveaux biomarqueurs**

L'exposome spatial est une combinaison unique de stress physiques (hypergravité pendant le décollage et l'atterrissage, microgravité durant le vol, radiations cosmiques et solaires, hypoxie hypobarique) et socio-environnementaux (confinement, isolement, perturbation du rythme circadien, hautes attentes en termes de performance, risques techniques ou d'erreurs fatales). Avec l'augmentation des missions spatiales, il est nécessaire de comprendre comment cet exposome perturbe le système immunitaire, et plus spécifiquement l'immunité humorale, et d'identifier quels stress ont le plus d'effet sur les répertoires d'anticorps. Pour déterminer quels stress ont le plus d'impact sur les répertoires BCR, nous avons utilisé trois modèles : le modèle murin de microgravité simulée appelé hypokinésie des membres postérieurs ou hindlimb-unloading (HU) et deux environnements terrestres extrêmes : des séjours de longues durées dans les stations Neumayer III et Concordia en Antarctique. Ces stations sont considérées comme des analogues de la Station Spatiale Internationale, à l'exception des stress gravitaires, et exacerbent les effets des stress chroniques. De plus, Concordia nous a permis d'analyser les effets de l'hypoxie. Grâce à ces modèles, nous avons montré que 21 jours de HU induisent des changements dans le répertoire d'IgM murin qui sont environ 3 fois moins importants que chez des souris âgées. Lors des hivernages antarctiques, nous avons observé des individus présentant de faibles ou de fortes modifications de leur répertoire BCR, ces dernières étant caractérisées par des changements significatifs dans les régions CDR3s des sites de liaison à l'antigène, des changements dans les activités des enzymes spécifiques de la recombinaison V(D)J et des niveaux de stress perturbés. Ces résultats soulignent l'importance des stress physiques et socio-environnementaux dans les changements de répertoires d'anticorps, montrent l'existence de réponse individu-dépendantes chez l'homme et un potentiel effet de vieillissement accéléré.

Dans un second temps, nous avons recherché des biomarqueurs faciles à mettre en œuvre, rapides et peu coûteux pour surveiller l'état de santé des astronautes. Nous avons ainsi confirmé la pertinence du rapport neutrophiles/lymphocytes (NLR) et du rapport granulocytes/lymphocytes (GLR) grâce à deux modèles humains de microgravité simulée : le head down tilt bed-rest (HDTBR) et la dry-immersion (DI). Nous avons également identifié un nouveau biomarqueur : le rapport plaquettes/lymphocytes (PLR). De plus, l'étude de sujets soumis à la DI nous a permis d'identifier des causes aux augmentations de ces ratios liées au sexe. Compte tenu des progrès de la biotechnologie spatiale en matière de surveillance des cellules sanguines, nous pensons que ces ratios pourraient, dans un avenir proche, être facilement monitorés à bord des engins spatiaux participant aux futures missions dans l'espace lointain.

**Mots-clefs :** Répertoire BCR ; stress ; vols spatiaux ; biomarqueurs ; conditions extrêmes ; microgravité, vieillissement

---

## **Impact of extreme environmental conditions on human and murine antibody repertoires and definition of new biomarkers**

The space exposome is a unique combination of physical (hypergravity during take-off and landing, microgravity during flight, cosmic and solar radiation, hypobaric hypoxia) and socio-environmental (confinement, isolation, disruption of circadian rhythm, high performance expectations, technical risks or fatal errors) stresses. With the increase in space missions, it is necessary to understand how this exposome affects the immune system, and more specifically humoral immunity, and to identify which stresses have the greatest effect on antibody repertoires. To determine which stresses have the greatest impact on BCR repertoires, we used three models: the murine model of simulated microgravity known as hindlimb-unloading (HU) and two extreme terrestrial environments: long-term stays at the Neumayer III and Concordia stations in Antarctica. These stations are considered analogues of the International Space Station, except for gravitational stress, and exacerbate the effects of chronic stress. Concordia also enabled us to analyze the effects of hypoxia. Using these models, we have shown that 21 days of HU induce changes in the murine IgM repertoire that are about 3-fold less than in aged mice. Antarctic overwintering revealed individuals displaying weak or strong changes in their BCR repertoire, the latter characterized by significant changes in the CDR3s regions of antigen-binding sites, changes in the activities of enzymes specific to V(D)J recombination, and disrupted stress levels. These results underline the importance of physical and socio-environmental stresses in antibody repertoire changes, point to the existence of individual-dependent responses in humans and a potential accelerated aging effect.

Secondly, we looked for easy-to-implement, rapid and inexpensive biomarkers to monitor astronauts' state of health. We confirmed the relevance of the neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) and granulocyte/lymphocyte ratio (GLR) using two human models of simulated microgravity: head down tilt bed-rest (HDTBR) and dry-immersion (DI). We also identified a new biomarker: the platelet-to-lymphocyte ratio (PLR). In addition, the study of individuals subjected to DI enabled us to identify gender-related causes to increases in these ratios. Given the advances in space biotechnology for monitoring blood cells, we believe that these ratios could, in the near future, be easily monitored on board spacecraft participating in future deep space missions.

**Keywords:** BCR repertoire; stress; spaceflight; biomarkers; extreme conditions; microgravity.