HAL
open science

Effets d'une exposition chronique au césium 137 à faibles doses sur la progression de l'athérosclérose

Clélia Le Gallic

To cite this version:

Clélia Le Gallic. Effets d'une exposition chronique au césium 137 à faibles doses sur la progression de l'athérosclérose. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA114817 . tel-01168631

HAL Id: tel-01168631

https://theses.hal.science/tel-01168631v1

Submitted on 26 Jun 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE : Toxicologie

ANNÉE 2014 - 2015 SÉRIE DOCTORAT N°

THÈSE DE DOCTORAT
soutenue le 21/04/2015

par

Clélia LE GALLIC

Effets d'une exposition chronique au césium 137 à faibles doses sur la progression de l'athérosclérose

Directrice de thèse : Dr. Stéphanie LEHOUX (Université Mc Gill, Montréal, Canada)
Co-directrice de thèse : Dr. Teni EBRAHIMIAN (IRSN, Fontenay-aux-Roses, France)

Composition du jury :

Rapporteurs : Pr. Sarah BAATOUT (SCK•CEN, Mol, Belgique)
Dr. Philippe LESNIK (UMR_S 939 Inserm/UPMC, Paris, France)

Examinateurs : Dr. Isabelle CORRE (CRCNA UMR Inserm U892/CNRS, Nantes/ Angers, France)
Pr. Bernard LEVY (HEGP, Paris, France)

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
Pôle RadioProtection de l'Homme, Service de RadioBiologie et d'Epidémiologie
Laboratoire de RadioTOXicologie expérimentale
31, avenue de la Division Leclerc
92262 Fontenay-aux-Roses

« Only those who will risk going too far

can possibly find out how far one can go ».

T.S. Eliot

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie mes rapporteurs : le Pr Sarah BAATOUT et le Dr Philippe LESNIK. Merci pour les échanges que nous avons pu avoir et pour le temps que vous m'avez accordé. Je remercie aussi le Dr Isabelle CORRE et le Pr Bernard LEVY pour leur présence dans mon jury en tant qu'examinateurs.

Mes remerciements vont également aux personnes de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire qui m'ont accueilli et permis de réaliser mon doctorat dans des conditions optimales : Mme Jocelyne AIGUEPERSE pour son accueil au sein du pôle de Radioprotection de l'Homme ; Mr Marc BENDERITTER et Mme Laurence ROY au sein du Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie ; Mmes Isabelle DUBLINEAU et Karine TACK, pour leur accueil au sein du Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale.

Je remercie chaleureusement le Dr Stéphanie LEHOUX. Merci à toi pour avoir dirigé ma thèse ! Merci pour tous les échanges et les conseils à caractères scientifiques (ou pas !) que nous avons pu avoir au cours de ces 3 années… Il n'est pas impossible que je vienne un jour poser mes valises du côté du Saint-Laurent ! Who knows ?!

Un immense merci (et même plus !) au Dr Teni EBRAHIMIAN, pour m'avoir encadré tout au long de ma thèse. Je ne sais par où commencer tant il y aurait à dire !… De Pierrelatte à Dublin, en passant par Giens, Lyon, Genève, ou le Stade de France (cri de groupiiiiie !)… Beaucoup d'excellents souvenirs ! Merci pour tout ce que tu m'as transmis au cours de ces 3 années ! Je suis vraiment honorée d'avoir été ta 1ère doctorante. Je te souhaite plein de bonheur avec l'arrivée de ton 2ème bout'chou.

Un grand merci à Christelle ELIE, Line MANENS (mercii pour tout !), Johanna STEFANI (ce merci arrivera jusqu'en Suisse j'en suis sûre ! ;)), Stéphane GRISON (allez la prochaine « mud » race, tu laisses le caméscope et tu rejoins la team !!) et Yohann PHALENTE (le grand Monsieur !) pour leur précieuse aide technique ! Sans oublier les équipes de zootechniciens sur FAR (Mélanie, Amandine…) et sur PIE (Thierry, Jean-Michel et Fred).

Merci à l'ensemble des chercheurs du LRTOX Dr Chrystelle IBANEZ, Dr Audrey LEGENDRE, Dr Jean-Marc BERTHO, Dr Yann GUEGUEN, Dr Philippe LESTAEVEL, Dr Maâmar SOUIDI, Dr Céline DINOCOURT. Et aux « nouvelles » arrivantes, Dr Florence MILLER et Dr Juliana VIEIRA DIAS. Merci à tous pour vos précieux conseils et vos encouragements, et pour tous les bons moments que nous avons passés au cours de ces 3 ans presque et demi.

Merci également au Dr Christine TESSIER et David SUHARD (pour tous les moments de marrade à PIE ☺) du LRC.

Merci à l'ensemble des équipes des laboratoires du service : LEPID, LDB, LR2I et L3R. Merci aussi à Véronique JOFFRES pour son aide administrative, ainsi qu'à Chloé.

Merci aux (nombreux !) stagiaires du LRTOX... Louison et Baptiste en premier lieu, merci pour votre aide apportée sur le projet, et pour les beaux résultats que nous avons eu ! Je vous souhaite plein de réussite dans vos projets... Je n'oublie pas ma CécilixXx, Sylvie, Nour, Charlotte, Marlène... La team des ELLEsRTOX !

Un très grand merci aux Girlzz du bureau d'à côté : Stefania, aka Ma Gazelle Brutasse préférée, Stefinia PH ! Surtout, garde cette bonne humeur qui te caractérise, ton humour et ta répartie ! A très vite pour une prochaine course !! #alwaysontherun ! Ma Ch'ti Marie (à prononcer Maraïlle), tu te souviens au début dans l'antichambre ?! Hahaha !! Merciiiiii les filles pour tous ces moments passés ensembles! Vous êtes au top ! Bonne continuation à vous, you're the next ;)

Merci à mon co-bureau, Brice, aka Brikou, Braïllsse ! Merci pour tout ce que l'on a partagé - en plus du bureau ! Merci de m'avoir supporté ! Je te souhaite le meilleur pour la suite (hééééé tu connais l'histoire du kiwi ? - Comment est votre blanquette ?…)...

Merci aux ami(e)s docteurs (ou en devenir), rencontré(e)s à l'IRSN... Clémentine (merci pour tous les bons moments passés ensemble au LRTOX

(ma colloc' atittrée de congrès) et en dehors !), Raphaëlle, Benoît (merci pour les moments de « pauses » et pour ta précieuse aide sur la fin, je suis sûre que tu sauras de quoi je parle !), Cyprien (ne change rien tu es parfait ton flegme à tout épreuve va me manquer c'est certain!), Amélie, Aurélie, Elodie… Mention spéciale à Jean-Victor, Zakaria (que de souvenirs !) et Fabien : les co-fondateurs de l'AD'i[N] ! Merci pour votre amitié.

Merci à Ma Cricriiiii d'amouuuur (Doc Christelle D, t'es grillée) ! Merci pour cette amitié que nous avons liée depuis les « fameuses » JdT au Croisic… et pour tous les souvenirs qui s'en suivent, et ceux à venir ! (Euuuuh quand est ce qu'on part à Toulouuuuuuse ?) <3

Merci à ma Poulpinette en chef n°1, Aurore (aka Toutoule, tu ne m'en voudras pas d'avoir écrit ça hein ?!). Merci pour tous les bons moments passés ensemble (et avec la Poulpi n°3 – Maeva ☺)… Depuis Dublin (aaaa Dublin ! c'était (trop) bien !!), en passant par Larmor Plage… Bon, quand est ce qu'on repart ? et on embarque la Cricri !

Merci à ma Sandra (Mme Adecco ?! =P), tu assures, tu sais ça ? ;) Je suis vraiment contente que nous nous soyons retrouvées…

Merci aux amis du master BIP : ma Garth' adorée (you're the best <3), Renaud («Gonna rock dem rock dem all, gonna beat dem beat dem all » + Videlles song = combo gagnant), Samuel (aka SamuLe, ma loutre préférée), Vincent « CirrotéaU », Isaaaa, Sandrine (Drinette), Basile (Ekxcuzhè moua ché

oune petite question, je n'ai pas bien compris ! - difficile l'accent par écrit), Manalouuuu et tous les autres ! Même si le temps passe, même si nous avons emprunté des routes diverses et variées, nous arriverons toujours à nous retrouver… A quand le prochain Videlles ? ;)

Merci à ma Chuiit Team adorée - des mecs balezzz qui pèsent ! : Yoann aka YoChouuuuu (best coach ever (#onlacherien + #BoostBirHakeim), et ami de surcroit, je m'en souviendrais de cette soirée de décembre 2014 !) ; Rachid, aka RO (encore désolée de t'avoir cassé la 1ère journée… ; Jean (Toi, t'es le mec balèzz qui force ! ou qui pousse ? je ne sais plus :P) ; Solène aka Solénoïde; Hugues & Lou ; Gary Gary Gary, sans oublier Solal (pour m'avoir supporté sur la fin !)! Merci les copains d'avoir été présents et de m'avoir soutenu dans les derniers moments. Longue vie à la Chuiit Team !

Merci à tous mes ami(e)s (de Paris et d'ailleurs)… Rym(ounette), Max, Manue, Nath, Auré, Axou, Sophie, Sév & Souf, Gannou & Mathieu, Djoulaïe, Pierrot, Jérem', Clint & Mathilde, Lou, Laurent, Franck, Sandrine (et la team des Mars Attack !) et aux collègues de l'EcoTrail avec qui j'ai pu participer à de magnifiques événements (et pour la sacrée ambiance qu'il y a pu avoir !) : ma Fanny (duo de choc ! Prête pour de nouvelles aventures ?) Clément, Romain, Jordan, Matthieu, Flo, Grégoire et à tous ceux que j'oublie… Merci à tous d'avoir été là pour moi.

Mes remerciements vont également à tous les membres de ma famille en France ou un peu plus loin… Merci à ma famille du pays de l'Homme Intègre,

les Sanou, les Koanda… vos encouragements m'ont portés par-delà les frontières ! Merci à Nicole, Françoise, Jean-Christophe, merci aux tantes, aux oncles, aux cousin(e)s…

Et le plus important, merci à mes parents Claude et Claudine, qui ont toujours su me soutenir, m'encourager, qui ont toujours été là pour moi. Du fond du cœur, je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour tout ce que vous m'avez transmis et pour ce que vous m'avez permis de devenir. Sans vous, je ne serais jamais arrivée là où je suis maintenant. Merci à mes little Sis' & Bro', Clément et Clara.

Merci pour tout.

Je dédie cette thèse à mes grands-parents.

SOMMAIRE

Remerciements ..... - 7 -

Résumé ..... - 17 -

Summary ..... - 19 -

Abréviations ..... - 21 -

Liste des figures ..... - 23 -

Liste des tables ..... - 27 -

AVANT-PROPOS ..... - 31 -

INTRODUCTION ..... - 37 -

I. « Souvenirs » de physique nucléaire ..... - 37 -

1. A la découverte de la radioactivité et du rayonnement ionisant ..... - 37 -

2. Des doses, des unités, différents modes d'exposition ..... - 38 -

3. Notion d'effets déterministes et stochastiques des rayonnements ionisants ..... - 47 -

II. Le césium ..... - 51 -

1. Généralités ..... - 51 -

2. Origines du césium 137 ..... - 55 -

3. Exposition des populations au césium 137 ..... - 61 -

4. Biocinétique du césium 137 ..... - 65 -

5. Toxicité et effets physiologiques du césium ..... - 71 -

III. L'athérosclérose ..... - 85 -

1. Généralités ..... - 85 -

2. Physiopathologie de l'athérosclérose ..... - 95 -

3. Stress oxydant et athérosclérose ..... - 103 -

4. Exposition aux rayonnements ionisants et CVD ..... - 109 -

5. Modèles d'étude de l'athérosclérose ..... - 119 -

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS ..... - 125 -

MATERIELS ET METHODES ..... - 129 -

I. Modèle animal – expérimentations *in vivo* ..... - 129 -

1. Vue générale du protocole d'exposition des animaux ..... - 129 -

2. Prélèvements tissulaires et analyses ..... - 130 -

II. Culture cellulaire – expérimentations *in vitro* ..... - 133 -

1. Human Aortic Smooth Muscle Cells (HAoSMC) ..... - 133 -

2. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) ..... - 137 -

RESULTATS ..... - 141 -

RESULTATS *IN VIVO* ..... - 143 -

I - Effets d'une exposition à court terme au césium 137 *in vivo* dans un modèle d'athérosclérose murin ApoE$^{-/-}$ ..... - 143 -

II – Effets d'une exposition chronique au cesium 137 *in vivo* – moyen/long terme dans un modele d'athérosclerose murin ApoE$^{-/-}$ ..... - 171 -

RESULTATS *IN VITRO* ..... - 206 -

I – Etude *in vitro* irradiation chronique à faible dose et faible débit de dose sur des cellules endothéliales (HUVECs) ..... - 206 -

II – Etude préliminaire d'exposition *in vitro* – modele HAoSMC ..... - 234 -

1. « Prolifération » - expression génique de PCNA ..... - 234 -

2. Profil inflammatoire ..... - 235 -

3. Expression génique collagènes / MMP ..... - 237 -

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES ..... - 242 -

CONCLUSION GENERALE ..... - 256 -

VALORISATIONS ..... - 260 -

1. Publications ..... - 260 -

2. Communications ..... - 261 -

3. Autres ..... - 263 -

ANNEXE I ..... - 266 -

ANNEXE II ..... - 288 -

Références bibliographiques ..... - 298 -

RÉSUMÉ

Suite aux accidents nucléaires de Tchernobyl (1986) ou Fukushima (2011), de grandes quantités de radioéléments ont été disséminées dans l'environnement. Parmi ces derniers, le césium 137 est le radionucléide le plus abondant et constitue la principale source d'exposition des populations avoisinantes sur le long terme, notamment par son intégration dans la chaîne alimentaire. Ce sont quelques milliers de becquerels qui sont quotidiennement ainsi ingérés. Un important questionnement concerne donc les effets potentiels que peuvent induire une telle exposition sur les fonctions physiologiques.

Concernant le système cardiovasculaire, il existe une corrélation entre la dose d'exposition et la fréquence d'apparition de pathologies cardiovasculaires. Cependant, lorsqu'il s'agit d'une exposition à faibles doses, comme en cas de situations post-accidentelles, les études ne sont pas toutes en accord, dû au caractère multifactoriel de ces maladies, une grande prudence est nécessaire quant à l'interprétation des données épidémiologiques.

Ainsi, ce travail de thèse vise à compléter les études épidémiologiques disponibles suivant une exposition interne à faibles doses de césium 137, et plus particulièrement dans le cadre de la pathologie athéromateuse. En effet, l'athérosclérose est reconnue comme étant la 1ère cause de mortalité/morbidité dans les pays industrialisés.

Des animaux prédisposés à la pathologie (souris ApoE$^{-/-}$), ont été exposés à des concentrations de césium de 4 à 100 kBq.L^{-1} pendant 3, 6 ou 9 mois.

Ainsi, au bout de 3 mois d'exposition, les animaux ayant reçu la plus forte concentration présentent une augmentation de certains paramètres inflammatoires, notamment IFN-γ et VCAM-1, ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur média-intima comparé aux animaux témoins. De plus, nous avons noté des variations concomitantes de l'expression d'enzymes pro/anti oxydantes (p47, p67, GPx). Ces observations ne perdurent pas au fil du temps. En effet, après 6 et 9 mois d'exposition, les plaques d'athérome qui se sont formées présentent des caractéristiques de stabilité plus importantes que les animaux témoins, avec des paramètres pro-inflammatoires (CRP, TNF-α, MCP-1 et IFN-γ) diminués, une augmentation du contenu en collagène, ainsi qu'une baisse de l'expression de certaines collagénases.

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une exposition interne chronique à faibles doses de césium 137 ne potentialise pas la pathologie athéromateuse dans notre modèle expérimental. Une telle exposition induit la mise en place d'une réponse adaptative au cours du temps, allant en faveur d'une amélioration du phénotype des plaques d'athérome, en agissant sur la balance des cytokines pro/anti inflammatoires, ainsi qu'une modulation du système anti-oxydant.

Mots clés : athérosclérose, césium 137, exposition chronique, faibles doses, inflammation, stress oxydant

SUMMARY

Large amounts of radionuclides were released in the environment after the Chernobyl (1986) or Fukushima-Daichii (2011) nuclear accidents, and mostly cesium 137. Populations living in contaminated territories are chronically exposed to radionuclides by ingestion of contaminated food. There is a real interrogation about the potential effects that could be induced following such ionizing exposure on physiological functions in the long term.

Concerning the cardiovascular system, there is a correlation between the irradiation dose and the appearance of cardiovascular diseases. However, when we focused on post-accidental situations, with a low dose exposure, available data are not all in accordance, due to multifactorial aspect of these pathologies. Epidemiological results should be interpreted carefully.

Thus, the aim of my thesis is to complete epidemiological studies about chronic internal γ low dose exposure, using cesium 137, in an atheromatous context. Atherosclerosis and its consequences are known to be the main cause of mortality/morbidity in industrialized countries.

Predisposed animals (ApoE$^{-/-}$ mice) were exposed to ^{137}Cs through the drinking water. The concentration range was 4 to 100 kBq.L^{-1}, to surround concentration found in contaminated territories around Chernobyl. Exposure times were 3, 6 or 9 months to follow atherosclerosis progression.

After 3 months exposure, for the early stages, mice exposed to the highest dose presented an increase in some inflammatory cytokines, notably IFN-γ and VCAM-1, with an intimal-medial thickness increased compared to non-exposed animals. Moreover, at this time exposure, we noticed concomitant variation of genic expression of pro and anti-oxydative enzymes (p47, p67, GPx). These effects are only transient and do not perdure over the time. Indeed, after 6 and 9 months exposure, atheromatous plaque observed in the aortic sinus, present more stability parameters than the control group (collagen), with also a decrease in pro-inflammatory profile cytokines expression (CRP, TNF-α, MCP-1 et IFN-γ), and MMPs expression, and increase in GPx activity compared to the control group.

All together, these results suggest that chronic internal exposure to low dose ionizing radition with ^{137}Cs do not potentiate atherosclerosis progression. Such exposure induces an adaptive response along the experimental process, with an amelioration of atheromatous plaque phenotype, acting on the balance of pro/anti-inflammatory cytokines, pro/anti oxydant system.

Keywords: atherosclerosis, cesium 137, chronic exposure, low doses, inflammation, oxidative stress

ABRÉVIATIONS

^{137}Cs	Cesium 137
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIEA	Agence Internationale de l'Energie Atomique
ApoE	Apolipoprotéine E
ARNm	Acide RiboNucléique messager
αSMA	α smooth muscle actin
ASN	Autorité de Sûreté Nucléaire
βact	Beta actin
Bq	Becquerel
CAT	Catalase
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
CIPR	Commission Internationale de Protection Radiologique (ou ICPR en anglais)
Col1a2	Collagen, type I alpha 2
Col3a1	Collagen, type III alpha 1
CRP	C Reactive Protein, Protéine C réactive
Ct	Cycle threshold (en PCR)
CVD	Cardiovascular disease
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DHE	Dihydroethidium
ER	Espèce Réactive
ERN	Espèce Réactive de l'Azote
ERO (ou ROS)	Espèce Réactive de l'Oxygène
E-SEL	E-Selectin
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPx	Gluthathione Peroxydase
Gy	Gray
HAoEC	Human Aortic Endothelial Cell
HAoSMC	Human Aortic Smooth Muscle Cell
HDL	High density lipoprotein
HO-1	Heme-oxygenase 1

HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFNγ	Interferon γ
IL	Interleukine
KO	Knock-Out
LDL	Low density lipoprotein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MMP	Matrix metalloproteinase
MMP-13	Matrix metalloproteinase 13, collagenase 3
MMP-2	Matrix metalloproteinase 2, gelatinase A
MMP-8	Matrix metalloproteinase 8, neutrophil collagenase
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO Synthase
NOX	Nitrogen oxides
Nrf2	Nuclear factor-like 2
0_2.-	Anion Superoxyde
SOD	SuperOxyde Dismutase
Sv	Sievert
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
UNSCEAR	United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VSMC	Vascular Smooth muscle cells

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Le programme ENVIRHOM : d'une contamination ENVIRonnementale à la santé de l'Homme, *source : IRSN* ..... - 32 -

Figure 2 Pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants ..... - 38 -

Figure 3 Ordre de grandeur des doses absorbées en Gray ..... - 40 -

Figure 4 Echelle de radiation en Sievert ..... - 41 -

Figure 5 Relation entre les unités de doses en radiobiologie *(adapté de Borghini, Gianicolo et al. 2013)* ..... - 42 -

Figure 6 Les modes d'exposition aux rayonnements ionisants ..... - 44 -

Figure 7 Les sources d'exposition aux rayonnements ionisants ..... - 45 -

Figure 8 Ampoule de césium *(Dennis s.k collection)* ..... - 51 -

Figure 9 Equation de désintégration du césium 137 ..... - 53 -

Figure 10 Carte des dépôts de césium 137 en Europe après l'accident de Tchernobyl ..... - 58 -

Figure 11 Carte des dépôts de radiocésium après l'acident nucléaire de Fukushima *(Yoshida 2012)* ..... - 60 -

Figure 12 Accumulation radio-isotopes dans divers organes chez des enfants et des adultes décédés en 1997 *(Bandazhevsky 2003)* ..... - 67 -

Figure 13 Modèle de biocinétique du cesium. Les flèches pleines représentent les flux plasmatiques, les flèches discontinues d'autres flux *(Leggett, et al. 2003)* ..... - 69 -

Figure 14 Atrophie de l'épithélium germinal, azoospermie complète, chez le Beagle injecté par voie intra-veineuse au ^{137}Cs *(Nikula et al. 1995)* ..... - 74 -

Figure 15 Analyse phénotypique des cellules sanguines circulantes après exposition au ^{137}Cs à 20 kBq.L^{-1}. ..... - 77 -

Figure 16 Une contamination au césium 137 n'entraîne pas de modification histologique de l'épithélium gastro jéjunum de rats *(Dublineau et al. 2007)* ..... - 79 -

Figure 17 Etude des cellules apoptotiques au niveau de l'épithélium jéjunal par la technique TUNEL. ..... - 80 -

Figure 18 Activité enzymatique de CYP7A1 et CYP27A1 hépatique (métabolisme du cholestérol) après 3 mois d'exposition au césium *(Souidi et al. 2006)* ..... - 81 -

Figure 19 Pression artérielle moyenne (en mmHg) chez des rats exposés chroniquement au ^{137}Cs pendant 3 mois (500 Bq.kg^{-1} dans l'eau de boisson) *(Gueguen et al. 2008)* ..... - 83 -

Figure 20 Observations de calcifications aortiques observes au scanner sur une momie de l'Egypte ancienne *(Thompson et al. 2013)* ..... - 86 -

Figure 21 Les 10 principales causes de mortalité dans le monde en 2012 *(OMS, 2012)* .... - 87 -

Figure 22 Illustration d'une coupe transversale d'une artère musculaire (à gauche) ; Préparation histologique montrant une artère (A) et une veine (V) (à droite) ..... - 90 -

Figure 23 Etapes d'initiation de la formation de la plaque d'athérome ..... - 98 -

Figure 24 Plaque « vulnérable » et plaque « stable » *(Libby 2002)* ..... - 99 -

Figure 25 Coupe histologique d'une artère présentant une rupture de la plaque d'athérome *(Virmani et al. 2006)* ..... - 101 -

Figure 26 Structure de la NADPH oxydase *(Dusting et al. 2005)* ..... - 104 -

Figure 27 Les acteurs du système redox ..... - 106 -

Figure 28 Modification de l'équilibre redox cellulaire lors de la production aigue et chronique d'ER *(d'après Beaudeux J.-L. et al, 2006)* ..... - 107 -

Figure 29 Etudes des lésions radio-induites au niveau de l'artère carotide. ..... - 111 -

Figure 30 Effets des rayonnements ionisants sur le système cardiovasculaire dans le cadre de traitement par radiothérapie pour les cancers du sein, du lymphome de Hodgkin et des cancers de la sphère ORL. ..... - 113 -

Figure 31 Représentation schématique d'une lipoprotéine. ..... - 120 -

Figure 32 Comparaison de la progression des lésions athéromateuses chez l'animal et chez l'Homme *(Stylianou et al. 2012)* ..... - 121 -

Figure 33 Protocole expérimental général *in vivo* ..... - 129 -

Figure 34 Schéma d'un compteur de scintillations *(Source : Manticorp)* ..... - 131 -

Figure 35 Protocole expérimental - *in vivo* irradiation chronique à faibles doses ..... - 137 -

Figure 36 Expression génique de PCNA des HAoSMC après une exposition de 72h au césium 137 *via* le milieu de culture ..... - 235 -

Figure 38 Concentration (en pg/mL) de MCP-1 et IL-6 dans les surnageants de culture des HAoSMC après une exposition de 72h au césium 137 ..... - 236 -

Figure 39 Expression génique des collagènes 1 et 3 par les HAoSMC après une exposition de 72h au césium 137 ..... - 237 -

Figure 40 Expression génique des MMP-1 et -2 par les HAoSMC après une exposition de 72h au césium 137 ..... - 238 -

Figure 41 Altérations biologiques et moléculaires radio-induites sur le système vasculaire pour des doses supérieures à 1- 2 Sv *(Borghini et al. 2013)* ..... - 244 -

LISTE DES TABLES

Table 1 Ordre de grandeur de l'activité de différentes sources radioactives naturelles et artificielles ..... - 39 -

Table 2 Des faibles aux fortes doses ..... - 43 -

Table 3 Effets déterministes décrits pour des expositions à des rayonnements gamma ou X, *source INRS* ..... - 48 -

Table 4 Propriétés radioactives des 3 principaux isotopes du césium ..... - 52 -

Table 5 Echelle INES - International Nuclear Scale - *source ASN* ..... - 56 -

Table 6 Teneur en césium (134 + 137) de produits de la consommation à Korma, Biélorussie, en $Bq.kg^{-1}$ ..... - 62 -

Table 7 Ingestion quotidienne de denrées contaminées au césium 137 et activité moyenne en césium 137 de produits alimentaires retrouvés en zone contaminée autour de Tchernobyl *(Handl, Beltz et al. 2003)* ..... - 63 -

Table 8 Concentrations relatives du césium et du potassium stables dans divers tissus et organes, en prenant comme référence la concentration du muscle strié. *Source : Le Césium – de l'environnement à l'Homme* ..... - 67 -

Table 9 Effets observés suite à une exposition à fortes doses de césium 137 *(Lestaevel et al. 2010)* ..... - 75 -

Table 10 Effets recensés après exposition à faibles doses de césium 137 *(Lestaevel et al. 2010)* ..... - 84 -

Table 11 Classification anatomo-pathologique des lésions de l'AHA ..... - 89 -

Table 12 Facteurs de risque de l'athérosclérose « non-modifiables » et « modifiables » .. - 92 -

Table 13 Biomarqueurs de la dysfonction endothéliale ..... - 96 -

Table 14 Classification et nomination des MMPs ..... - 100 -

Table 15 Risque relatif des événements cardiovasculaires après radiothérapie selon les cancers en France en 2006. (*Source: Revue Médecine/Sciences 2010, 26 : 740-6)*..... - 110 -

Table 16 Résumé des mesures observées suite à une exposition à faibles doses. ..... - 116 -

Table 17 Modèles animaux de l'athérosclérose *(Xiangdong et al. 2011)*..... - 122 -

Table 18 Doses moyennes absorbées *(Bertho et al. 2010)*..... - 130 -

Table 19 Composition du milieu de culture des HAoSMC ..... - 133 -

Table 20 Préparation des milieux de culture contaminés au césium 137 ..... - 134 -

Table 21 Références gènes expérimentations *in vitro*..... - 135 -

Avant-propos

AVANT-PROPOS

Depuis 2001 l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), a lancé le programme « ENVIRHOM ». Celui-ci a pour objectif une meilleure évaluation des risques engendrés par une exposition chronique à de faibles doses de radioéléments tant sur la santé de l'Homme que sur l'impact environnemental. Le programme se décline en 2 composantes : Envirhom-Eco (conséquences sur l'environnement) et Envirhom-Santé (conséquences sur la santé de l'Homme).

En 2009, MELODI[1] (*Multidisciplinary European Low Dose Initiative*), une structure associative rassemblant les principaux membres européens de la recherche dans le domaine des faibles doses de rayonnements ionisants est créée. Son objectif principal est de structurer et de mutualiser les moyens dédiés aux recherches de cette thématique, à l'échelle européenne. Cette structure de gouvernance s'appuie sur le réseau d'excellence DoReMi[2] (*Low dose research towards multidisciplinary integration)*, lancé en 2010 en tant que structure opérationnelle de MELODI. En octobre 2011, cette association a mis en place un agenda stratégique de recherche (SRA) qui priorise sur les vingt prochaines années les recherches sur les faibles doses de rayonnements ionisants, dans toute les disciplines, au niveau européen. LE SRA se structure autour de 6 thématiques clés : la forme de la relation dose-effet, la variabilité individuelle, les effets non-cancérogènes des rayonnements, la sensibilité tissulaire au cancer, les risques liés aux expositions internes et la qualité des rayonnements.

En termes de recherche dans le domaine cardiovasculaire, le consortium PROCARDIO[3], regroupant 12 institutions partenaires à travers l'Europe et la Russie, vise à investiguer les risques d'une exposition à faibles doses et à faibles débit de dose sur le système cardiovasculaire. Un objectif majeur est l'identification de nouveaux biomarqueurs de pathologies cardio-vasculaires radio-induites.

---

[1] Plus d'informations : http://www.melodi-online.eu/

[2] Plus d'informations : http://www.doremi-noe.net/

[3] Plus d'informations : http://www.procardio.eu/#

Le laboratoire de RadioToxicologie Expérimental (LRTOX) où j'ai effectué mon travail de thèse, s'intéresse plus particulièrement aux effets sous-jacents à une exposition à différents radioéléments (l'uranium, le strontium… et le césium) sur différents systèmes physiologiques. La **figure 1** reprend ainsi les différents axes de recherche menés au LRTOX : différentes situations d'exposition, différents radioéléments entraînant une contamination environnementale et dont les effets non-cancéreux sont étudiés sur des modèles expérimentaux représentant les différentes classes de la population générale.

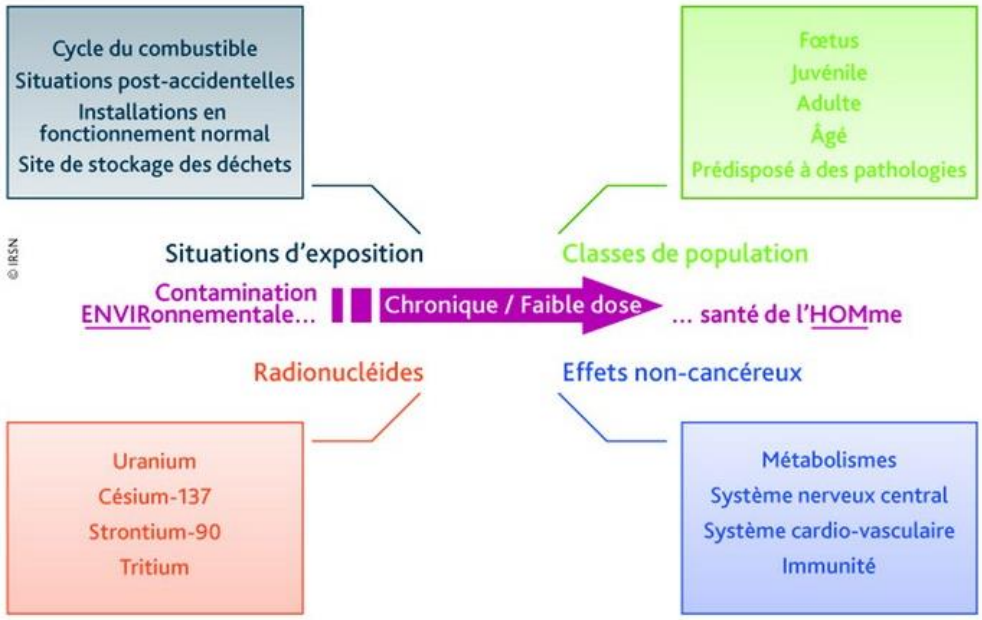


Figure 1 Le programme ENVIRHOM : d'une contamination ENVIRonnementale à la santé de l'Homme, *source : IRSN*

Ce projet de thèse vise à étudier plus spécifiquement les effets d'une exposition chronique à de faibles doses de césium 137 (^{137}Cs) sur la pathologie athéromateuse. Pour cela, des souris prédisposées à l'athérosclérose ($ApoE^{-/-}$) ont été exposées pendant différents temps (3, 6 ou 9 mois) et à différentes concentrations de ^{137}Cs, *via* l'eau de boisson, concentrations comparables à celles qui ont été retrouvées dans des denrées alimentaires consommées par la population vivant autour de la zone d'exclusion de Tchernobyl (4 $kBq.L^{-1}$, 20 $kBq.L^{-1}$ ou 100 $kBq.L^{-1}$) **(Handl et al., 2003)** .

L'objectif premier de cette étude est de pouvoir constituer des études phénoménologiques et compléter les études épidémiologiques. En effet, il n'existe pas à ce jour d'études décrivant les effets d'une exposition chronique à faibles doses sur la progression de l'athérosclérose.

Dans la partie introductive, nous ferons des brefs rappels de physique nucléaire, avant de poursuivre sur une partie consacrée au ^{137}Cs, radioélément d'intérêt, en présentant tout d'abord ces propriétés générales, puis une revue de la littérature portant sur des études expérimentales ayant trait à une exposition au césium à fortes et faibles doses.

La seconde partie de l'introduction sera consacrée à l'athérosclérose, « ma » pathologie d'intérêt, en en faisant une présentation générale, en insistant sur certains points essentiels qui ont été étudiés dans ce travail de thèse. Nous discuterons également des relations existantes entre l'exposition à des rayonnements ionisants sur l'apparition et la progression de cette pathologie cardiovasculaire.

A l'issue de l'introduction, nous verrons compendieusement les matériels et méthodes mis en œuvre dans notre étude, avec deux versants : *vivo* et *vitro*.

Les résultats seront subdivisés en deux parties (une partie *« in vivo »* et une autre *« in vitro »*, correspondant aux résultats obtenus avec les deux approches expérimentales, et seront présentés sous la forme d'articles.

Enfin, dans une dernière partie, nous discuterons et conclurons les résultats obtenus et les intègrerons dans un contexte plus général du domaine d'étude des effets des « faibles doses ».

Nous évoquerons également des différentes perspectives scientifiques et expérimentales qui découlent de ce travail.

Introduction

INTRODUCTION

I. « SOUVENIRS » DE PHYSIQUE NUCLÉAIRE

1. A la découverte de la radioactivité et du rayonnement ionisant

En 1886, Henri Becquerel alors qu'il travaillait sur des sels d'uranium, met en évidence que ces derniers impressionnent des plaques photographiques, qu'ils émettent un « rayonnement uranique ». Marie Curie observe également cette manifestation sur d'autres éléments. Ils obtiennent conjointement le prix Nobel de physique en 1903 pour leurs travaux sur la radioactivité naturelle.

La radioactivité est un phénomène physique naturel au cours duquel des noyaux atomiques instables –des radio-isotopes- se désintègrent en dégageant de l'énergie sous forme de rayonnement, en noyaux atomiques stables. Ainsi, les rayonnements ionisants se distinguent par leur nature, leur origine et leur énergie. Ils se présentent soit sous forme de particules (rayonnements α, β, protons, ou neutrons), soit sous forme d'ondes électromagnétiques (rayons X et γ). Ces différents rayonnements possèdent tous une énergie suffisamment importante pour arracher des électrons aux atomes de la matière rencontrée.

Le rayonnement α correspond à une fission nucléaire dans laquelle une particule d'hélium est émise. Ce rayonnement possède un très faible pouvoir de pénétration dans l'air, une simple feuille de papier permet de l'arrêter.

Le rayonnement β correspond à une désintégration dans laquelle il y a émission d'une particule β chargée positivement (positron) ou négativement (électron), rayonnement qui peut être arrêté par une feuille d'aluminium.

Quant au rayonnement γ, rayonnement électromagnétique, c'est le plus pénétrant des trois, puisque pour l'arrêter, il faut disposer d'une protection épaisse de béton ou de plomb (**figure 2**).

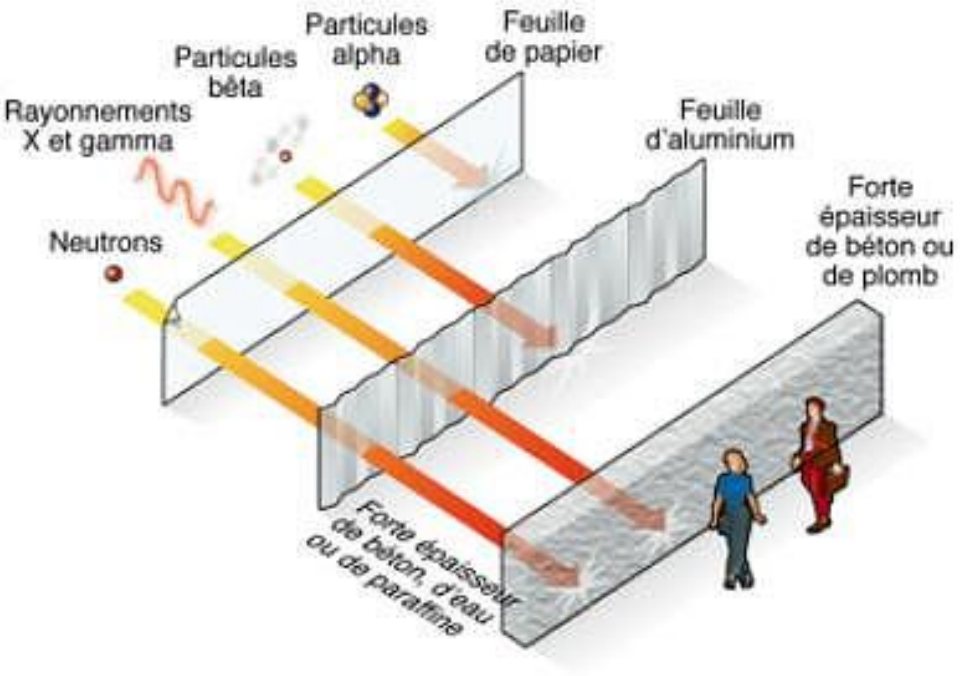


Figure 2 Pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants
Les particules α correspondent l'émission de noyaux d'hélium et sont arrêtées par une feuille de papier, les particules β composées d'électrons sont arrêtées par quelques millimètres d'aluminium, et les émissions γ sont quant à elles arrêtées par environ 1 mètre de plomb ou de béton.
Source : http://www.developpement-durable.gouv.fr/

2. Des doses, des unités, différents modes d'exposition

Afin de mesurer la radioactivité d'une part, et les effets biologiques d'autre part, différentes unités existent. Nous définirons brièvement les différents termes employés afin de limiter les confusions potentielles, surtout dans le domaine des « faibles doses » de rayonnement ionisant.

A. Activité radioactive

Le **Becquerel (Bq)** : donnée en hommage à Henri Becquerel, cette unité de mesure de l'activité d'une source radioactive, correspond à la dégradation (ou d'une transformation) d'un atome radioactif par seconde. Mesurable à l'aide d'appareils tel que le compteur Geiger, la **Table 1** illustre un ordre de grandeur de différentes sources radioactives. Cependant, cette unité ne prend pas en compte les différents effets biologiques induits et ne permet pas l'évaluation du risque encouru.

	Elément	Activité	
Sources radioactives naturelles	Eau de pluie	0,5 Bq/l	
	Eau de mer	14 Bq/l	
	Lait	70 Bq/l	
	Poisson	100 Bq/kg	
	Corps humain	120 Bq/kg	
	Pommes de terre	150 Bq/kg	
	Terre sédimentaire	400 Bq/kg	
	Engrais phosphatés	3 000 Bq/kg	
	Terre granitique	8 000 Bq/kg	
Sources radioactives artificielles	Uranium 238	37,2 millions de Bq/kg	soit 37,2 MBq/kg
	Plutonium 239	2 300 milliards de Bq/kg	soit 2,3 TBq/kg
	Radium 226	330 000 milliards de Bq/kg	soit 330 TBq/kg
	Césium 137	**3,2 millions de milliards de Bq/kg**	**soit 3 200 TBq/kg**

Table 1 Ordre de grandeur de l'activité de différentes sources radioactives naturelles et artificielles

Source : IRSN

B. Mesure de la dose absorbée

Le **Gray (Gy)** : du nom du physicien anglais Harold Gray, cette unité de mesure désigne une dose délivrée ou absorbée, et équivaut à l'absorption d'un joule d'énergie par kg de matière. Le Gray est souvent utilisé pour caractériser des expositions induisant des effets biologiques dits « déterministes » (comme des brûlures).

La **figure 3** représente des exemples de doses absorbées de façon « naturelles » ou « artificielles » : 0,001 Gy est la dose annuelle moyenne imputable au rayonnement γ ambiant en France; 60 Gy est une dose « thérapeutique », administrée de façon fractionnée dans le cadre d'un traitement par radiothérapie.

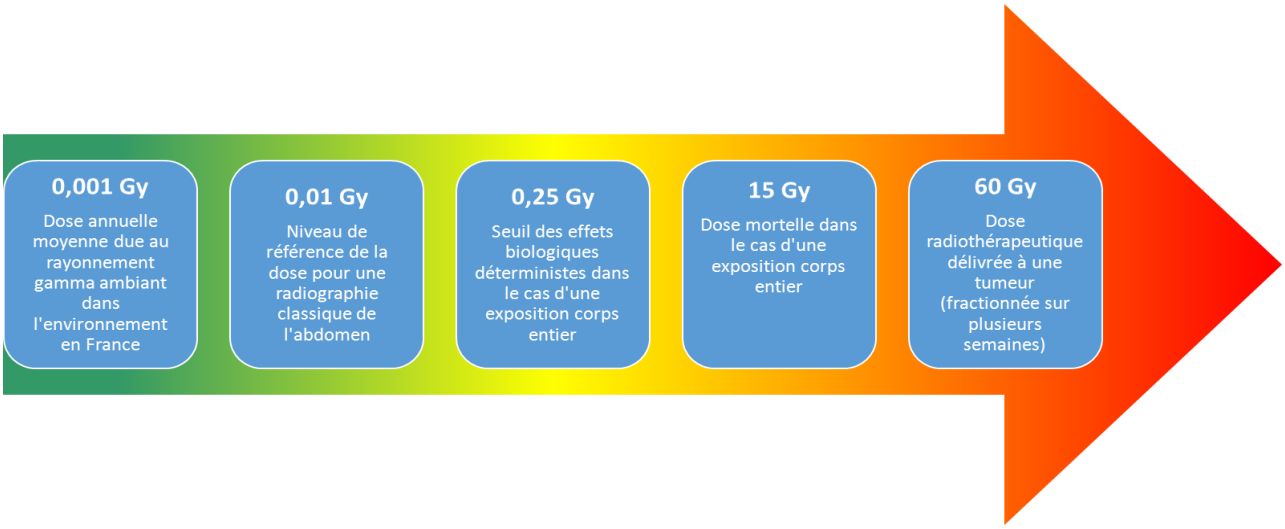


Figure 3 Ordre de grandeur des doses absorbées en Gray

Cependant, des expositions répétées atteignant la même dose absorbée ne comportent pas les mêmes risques, en fonction du type de rayonnement, aux conditions d'exposition et des tissus touchés. Ainsi, la dose absorbée ne permet pas de mesurer les conséquences biologiques d'une exposition, elle n'est pas représentative du risque sanitaire encouru.

Le **Sievert (Sv)** : du nom du radiobiologiste suédois Rolf Sievert, cette unité de mesure d'absorption de radioactivité, correspond au Gray multiplié par un facteur dépendant du type de rayonnement. C'est l'unité de la « dose équivalente » ou « dose efficace », indiquant le risque global et qui tient compte des effets biologiques induits par une exposition en fonction des organes touchés.

En France, la dose annuelle moyenne reçue, liée à la radioactivité naturelle, est comprise entre 2 et 3 mSv (liée notamment au radon, un gaz radioactif). La limite autorisée d'exposition aux rayonnements artificiels est de 1 mSv par an et par personne (la **figure 4** présente une échelle de radiation en Sievert).

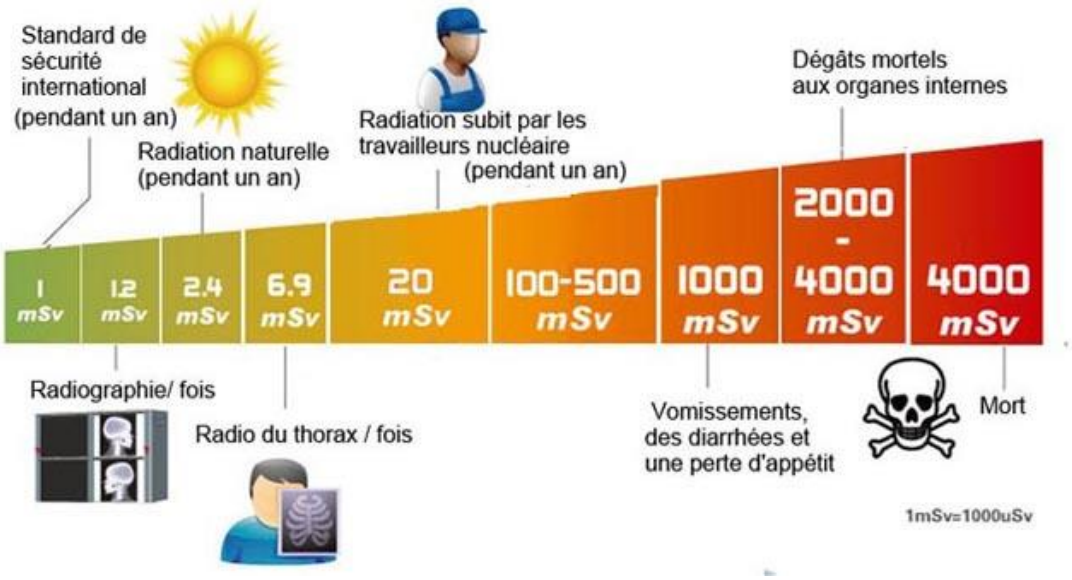


Figure 4 Echelle de radiation en Sievert

Très schématiquement, la relation entre les différentes unités et le rayonnement ionisant peut être symbolisée de la façon suivante : un enfant (A) lance des balles en directions d'un autre enfant (B). Le nombre de balles envoyées par A est comparable au nombre de rayonnements émis par la source radioactive, autrement dit, son activité (Becquerel). Le nombre de balles reçues par B représente la dose absorbée (Gray). Les marques laissées sur le corps de B, selon que les balles soient plus ou moins lourdes et les points touchés plus ou moins sensibles, représentent les effets produits, et sont comparables à la dose efficace (Sievert) (figure 5).

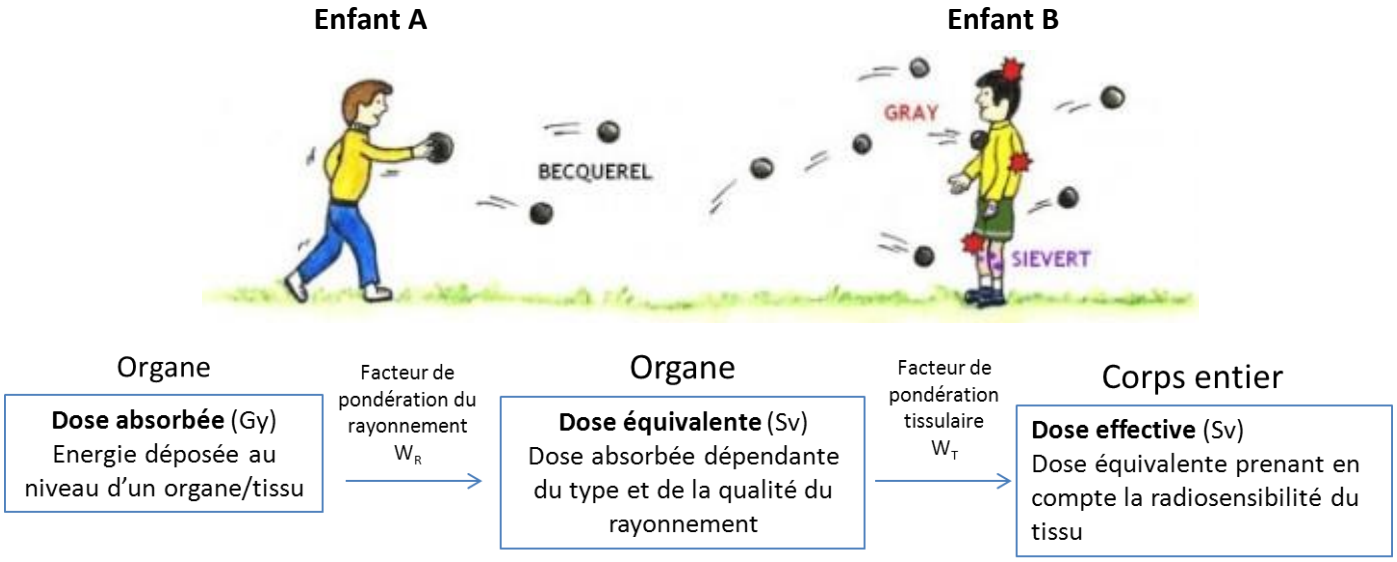


Figure 5 Relation entre les unités de doses en radiobiologie *(adapté de Borghini, Gianicolo et al. 2013)*

La dose équivalente correspond à la dose absorbée multipliée par un facteur de pondération biologique (W_R). Ce facteur vaut 1 pour les rayons X, gamma et bêta, 20 pour les rayons alpha et est variable pour les neutrons (dépend de leur énergie). A dose absorbée égale, les effets biologiques induits dépendent de la nature des rayonnements. La dose équivalente est dite « dose engagée » quand elle résulte de l'incorporation de radioéléments dans l'organisme jusqu'à élimination complète de ces derniers (par excrétion, ou décroissance physique).

La « dose efficace » correspond quant à elle à la somme des doses équivalentes pondérées délivrées aux différents tissus et organes, en tenant compte de leur radiosensibilité (facteur de pondération tissulaire W_T). Par exemple, pour les poumons et la moelle osseuse, W_T = 0,12.

Nous pouvons également aborder la notion de débit de dose, qui correspond à une dose délivrée par unité de temps. En effet, le débit de dose est un élément important à considérer car une dose similaire délivrée avec des débits de doses différents n'engendre pas les mêmes effets dans un système donné.

Nous avons notamment pu montrer l'importance du débit de dose sur des cellules endothéliales humaines irradiées pendant différents temps avec différents débits de doses. Pour une même dose reçue par les cellules, nous avons montré que certaines propriétés des cellules étaient modifiées/altérées. Un travail réalisé sur des cellules endothéliales irradiées à faibles doses et à faibles débits de doses a fait l'objet d'une soumission dans le journal « Radiation Research » (*cf Partie I des Résultats in vitro*).

D'une manière simplifiée/simpliste, on distingue 3 catégories de doses (**Table 2**) :

Dose	
Faible	< 100 mSv
Modérée	100 - 1000 mSv
Forte	> 1 Sv - Gy

Table 2 Des faibles aux fortes doses

Ainsi, les « faibles doses » concernent des effets pour lesquels le rayonnement ionisant est inférieur à 100 mSv (ou 100 mGy pour le rayonnement gamma).

C. Les différents modes d'exposition aux rayonnements ionisants

Les effets induits par les rayonnements ionisants (RI) sont fonction du type de rayonnement et du mode d'exposition. Il existe 3 modes d'exposition et 2 sources d'exposition, illustrés sur la **figure 6** :

- Exposition externe sans contact cutané : la source de RI est extérieure et à distance de l'organisme. Les rayonnements concernés sont essentiellement les gammas, X et neutroniques.
- Exposition externe par le contact cutané : la peau est irradiée par des dépôts de matière radioactive. Dans ce cas, le radioélément peut pénétrer à travers la peau lors d'une blessure cutanée, d'une plaie.
- Exposition interne : dans ce cas, les éléments radioactifs pénètrent dans l'organisme par inhalation (gaz, aérosols), par ingestion (alimentation), par voie oculaire ou par voie percutanée. L'exposition interne persiste tant que la substance radioactive n'a pas été éliminée par l'organisme.

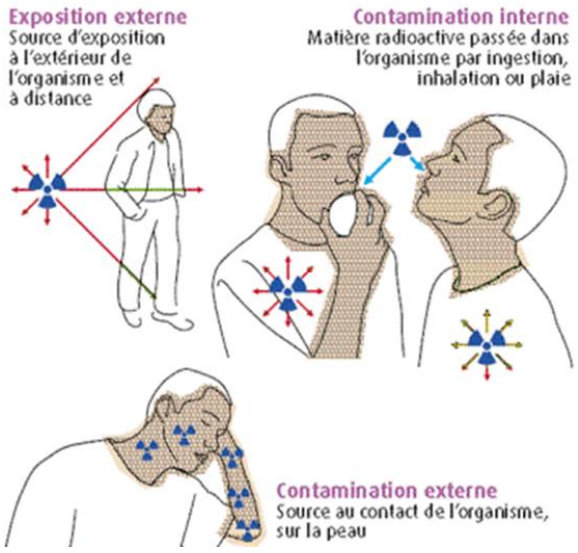


Figure 6 Les modes d'exposition aux rayonnements ionisants

En France, en 2005, l'exposition artificielle ou naturelle à des rayonnements ionisants conduit à une dose moyenne annuelle estimée à 3,3 mSv/an et par habitant. Cette dose dépend de la localisation géographique (**figure 7**).

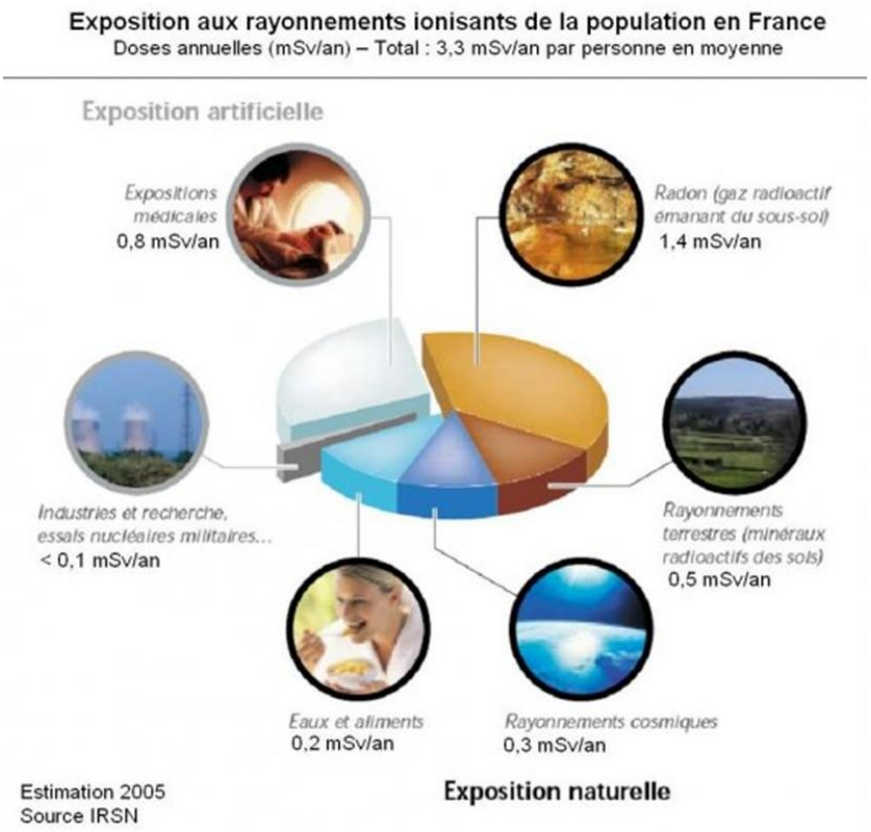


Figure 7 Les sources d'exposition aux rayonnements ionisants

3. Notion d'effets déterministes et stochastiques des rayonnements ionisants

Une exposition à des rayonnements ionisants n'est pas sans conséquence pour les systèmes biologiques. En effet, ces rayonnements perturbent les processus physiologiques au niveau cellulaire et tissulaire, en modifiant les propriétés chimiques des constituants cellulaires par ionisation, en induisant des altérations du matériel génétique entraînant des mutations.

La nature des lésions cellulaires dépend :

- du mode d'exposition,
- de la nature des rayonnements,
- du débit de la dose reçue,
- de facteurs physico-chimiques (température, forme chimique sous laquelle le radionucléide est incorporé…),
- du type de cellules exposées : certaines cellules sont plus radiosensibles que d'autres. Notamment les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches de la lignée germinale sont les plus radiosensibles. D'une façon générale, moins une cellule est différenciée, plus elle est radiosensible.

Les effets des rayonnements ionisants sur la santé sont très variables, ainsi que les conséquences sur l'organisme. Nous pouvons identifier 2 types d'effets encourus suivant une exposition à des rayonnements ionisants. Tout d'abord, les effets à court terme dits « effets déterministes ». Ils sont définis comme étant des effets pathologiques apparaissant lorsque l'on atteint un seuil de dose, un seuil d'irradiation (typiquement ces effets apparaissent à partir de la dose de 0,15 Gy de rayonnements X ou γ). Ils dépendent du tissu exposé et sont d'autant plus importants que la dose de rayonnement reçue est importante.

La **Table 3** liste les effets déterministes recensés à ce jour, pour une dose d'irradiation reçu supérieur à 0,15 Gy.

Effets déterministes recensés	Dose d'irradiation
Stérilité masculine temporaire	à partir de 0,15 Gy
Diminution temporaire des leucocytes	de 0,2 à 1 Gy
Nausée, asthénie **Modification de la formule sanguine** **Effet immunodépresseur** (risques d'infections) Sous surveillance médicale, le retour à la normale se produit rapidement.	de 1 à 2 Gy
Risque de stérilité féminine	à partir de 2,5 Gy
Stérilité masculine définitive	de 3,5 à 6 Gy
Aplasie (arrêt ou insuffisance du développement d'un tissu ou d'un organe). En l'absence de traitement, au moins la moitié des personnes irradiées meurent et il existe des risques de séquelles.	à partir de 4,5 Gy
Atteinte oculaire (survenue possible de cataracte de 1 à 10 ans après l'irradiation)	2 à 5 Gy
Atteinte gastro-intestinale	6 Gy
Atteinte pulmonaire	8 Gy
Coma, mort cérébrale	au-delà de 10 Gy

Table 3 Effets déterministes décrits pour des expositions à des rayonnements gamma ou X, *source INRS*

Les effets à plus long terme et aléatoires, dits « effets stochastiques » désignent quant à eux une probabilité d'apparition de l'effet, qui augmente avec la dose. Certaines mutations génétiques et pathologies telles que les cancers peuvent apparaître chez des personnes exposées à la même quantité de rayonnement sans que pour autant un seuil soit clairement défini/identifié.

Dans la dernière partie de l'introduction, nous aborderons plus en détails les effets d'une exposition à forte et faibles doses de rayonnement ionisant sur les pathologies cardiovasculaires.

II. Le césium

1. Généralités

A. Découverte

Le césium a été découvert dans l'eau minérale de Durkheim en Allemagne, en 1860 par Robert Wilhelm Bunsen et Gustav Robert Kirchoff, alors qu'ils étudiaient par spectroscopie son spectre d'émission, qui forme des raies bleues (à 456 et 459,7 nm). D'où son nom du latin *caesium*, le « bleu du ciel » (**figure 8**).

Figure 8 Ampoule de césium *(Dennis s.k collection)*

B. Propriétés

i. Propriétés physico-chimiques

Le césium est un élément appartenant à la famille des alcalins (1ère colonne du tableau périodique des éléments). Il porte le numéro atomique 55, et est le 45ème élément le plus présent dans la croûte terrestre, avec en moyenne 2,6 g par tonne métrique.

Seul le césium 133 est présent à l'état naturel dans deux minerais (dans la pollucite et la rhodizite). Sa concentration dans l'eau de mer est de 0,3-0,5 µg/L, dans la terre sèche 0,2-0,5 mg/kg, et chez l'homme, on estime à près de 1,5 mg le contenu en césium corps entier, avec des apports journaliers estimés à 10 µg.

Dans l'atmosphère, le césium est retrouvé sous forme d'aérosols et également d'oxyde et d'hydroxyde CsOH, présent dans l'eau. Cet élément est très soluble dans l'eau, et comporte une forte affinité pour les minéraux, plus particulièrement pour les argiles.

Le césium présente la même réactivité que le potassium, avec lequel il entre en compétition sans qu'un rôle physiologique lui soit pour autant attribué **(Leggett et al. 2003)**. Il a cependant été démontré que le césium pouvait induire un blocage des canaux K^+ au niveau des cellules musculaires lisses (dans un modèle expérimental de cellules musculaires lisses intestinales de lapin) **(Cecchi et al. 1987)**.

Le ^{137}Cs est considéré comme un radionucléide présentant une faible toxicité chimique, les effets engendrés étant plus particulièrement liés à son caractère d'émetteur β et γ au cours de sa désintégration (cf. « Propriétés radiologiques » et la partie « Toxicité du césium »).

ii. Propriétés radiologiques

Le césium possède 31 isotopes, dont la masse varie de 114 à 145. Seul l'isotope 133 est stable, alors que tous les autres sont radioactifs et produits à des fins industrielles. Au sein d'un réacteur nucléaire, ces isotopes radioactifs sont produits par la fission des noyaux d'uranium 235 et de plutonium 239.
Au sein de ces isotopes radioactifs, seuls 3 isotopes ont une période radioactive supérieure à 1 an : ^{134}Cs, ^{135}Cs et le ^{137}Cs. Leurs caractéristiques sont présentées dans la **Table 4**.

Isotope	1/2 vie (années)	Type de rayonnement émis (descendants)	Activité spécifique (Bq/mg)
^{134}Cs	2,06	β (γ,X)	$4,78 . 10^{16}$
^{135}Cs	$2,3 . 10^{6}$	β (γ)	$4,26 . 10^{10}$
^{137}Cs	30,2	β (γ)	$3,22 . 10^{15}$

Table 4 Propriétés radioactives des 3 principaux isotopes du césium

Le ^{137}Cs a une demi-vie radioactive de 30 ans ce qui en fait une source majeure de radioactivité à long terme. Il se désintègre par émission d'un rayonnement β^- pour donner à 5% du baryum-137 (^{137}Ba) stable et à 95% du baryum-137 métastable (^{137m}Ba). Ce dernier à une période radioactive de 2 minutes et retrouve son état stable en émettant un rayonnement γ (**figure 9**). Le ^{137}Cs est donc généralement considéré comme étant un émetteur β/γ.

$$^{137}_{55}\mathrm{Cs} \xrightarrow[30{,}15\ \text{ans}]{\beta^-\ 512{,}0\ \text{keV}} {}^{137m}_{56}\mathrm{Ba} \xrightarrow[2{,}552\ \text{min}]{\gamma\ 661{,}7\ \text{keV}} {}^{137}_{56}\mathrm{Ba}$$

Figure 9 Equation de désintégration du césium 137

C. Utilisations industrielles et médicales

Le césium naturel est aujourd'hui très peu utilisé. Facilement ionisable par la lumière UV, il est utilisé dans les cellules photoélectriques et les photocathodes sous forme d'alliage avec l'argent. Egalement présent dans les caméras de télévision, il permet l'obtention de l'image lumineuse télévisée. En 1955, Louis Essen, physicien anglais, a mis au point la première horloge atomique en utilisant le césium 133, ayant une précision de 5 secondes sur 300 ans !

Les propriétés radioactives du césium sont utilisées pour la production de sources à visées industrielles et médicales, en exploitant son rayonnement γ. Dans l'industrie, le césium est utilisé dans des irradiateurs pour la stérilisation des aliments.

Dans le secteur médical, dans certaines radiothérapies (brachythérapie), une source de césium radioactif est introduite au plus proche de la tumeur grâce à un cathéter. Le césium 137 est aussi utilisé pour irradier les produits sanguins, dans le but d'inhiber la division lymphocytaire pour prévenir les risques post-transfusionnels chez des patients receveurs immunodéprimés.

2. Origines du césium 137

A. Production de césium au sein des réacteurs

Les isotopes radioactifs du césium, dont le césium 137, ont une origine anthropogénique. Ils sont produits par des réactions nucléaires de fission et de capture neutronique : la fission des noyaux d'uranium 235 est provoquée par la capture d'un neutron par le noyau qui se trouve dans un état instable et qui se casse en deux parties. Cette fission entraîne la libération de 2 neutrons, appelés produits de fission primaire. Ces produits sont très instables et ils se désintègrent rapidement jusqu'à donner un produit stable – radioactif ou non, et constituent les produits de fission secondaires. Ainsi, le césium 137 est un produit de fission secondaire provenant de la chaîne de décroissance du tellure 137.

B. Situations accidentelles

i. Classification des accidents

L'échelle d'accidents nucléaires INES (*International Nuclear Events Scale*) permet de classer les différents évènements en fonction de leur gravité et leur incidence hors et sur site. Etablie depuis 1991 par l'Agence de Sûreté Nucléaire, révisée par l'AIEA (Agence Internationale à l'Energie Atomique) en 2008, s'appuyant sur des critères objectifs, elle permet une meilleure perception par le public et les médias de l'importance des incidents et des accidents nucléaires. Les évènements nucléaires et radiologiques sont classés en regard de leur impact dans différents domaines :

- « **Conséquences à l'extérieur du site** » : permet de rendre compte de l'impact sur les populations et l'environnement, avec les doses de rayonnements perçues à proximité, et les rejets de substances radioactives depuis l'installation ;
- « **Conséquences à l'intérieur du site** » : permet de rendre compte de l'impact sur les barrières et les contrôles radiologiques sans conséquence directe sur les populations

ou l'environnement. Elles incluent les rayonnements de fortes intensités et le rejet de substances radioactives imprévus au sein de l'installation ;

- « **Dégradation de la défense en profondeur** » : ce dernier aspect de l'échelle INES concerne les évènements sans impact direct sur les populations, mais pour lesquels les différentes mesures pour empêcher la survenue de l'accident n'ont pas fonctionnées correctement.

Chaque évènement doit être étudié précisément sous chacun de ces 3 aspects, et est classé au niveau le plus élevé atteint sous l'un des 3 angles. La **Table 5** correspond à l'échelle INES révisée de 2008.

	Conséquences à l'extérieur du site	**Conséquences à l'intérieur du site**	**Dégradation de la défense en profondeur**
7- Accident majeur	Rejet majeur : effets étendus sur la santé et l'environnement		
6- Accident grave	Rejet important susceptible d'exier l'application intégrale des contre-mesures prévues		
5- Accident	Rejet limité susceptible d'exiger l'application partielle des contre-mesures prévues	Endommagement grave du cœur du réacteur/des barrières radiologiques	
4- Accident	Rejet mineur : exposition du public de l'ordre des limites prescrites	Endommagement important du cœur du réacteur/des barrières radiologiques; Exposition létale d'un travailleur	
3- Incident grave	Très faible rejet : exposition du public représentant une fraction des limites prescrites	Contamination grave; Effets aigus sur la santé d'un travailleur	Accident évité de peu; Perte des barrières
2- Incident		Contamination importante; Surexposition d'un travailleur	Incidents assortis de défaillances importantes des dispositions de sûreté
1- Anomalie			Anomalie sortant du régime de fonctionnement autorisé
0- Ecart	Aucune importante du point de vue de la sûreté		
Evénements hors échelle	Aucune pertinence du point de vue de la sûreté		

Table 5 Echelle INES - International Nuclear Scale - *source ASN*

A la fin du XXème et début XXIème siècle, deux accidents nucléaires majeurs (7 sur l'échelle INES) et un accident (5 sur l'échelle INES) se sont produits, entraînant la dissémination dans l'environnement d'une quantité très importante de radioéléments conduisant à l'exposition des populations avoisinantes, parmi lesquels le césium 137 occupe une part prépondérante.

ii. Tchernobyl, Ukraine – avril 1986

Le 26 avril 1986, lors d'un test de sécurité, le réacteur n°4 de la centrale explose entraînant des rejets radioactifs importants. Ces produits radioactifs sont émis dans l'atmosphère jusqu'à plus de 1 200 mètres d'altitude, et ce panache radioactif se disperse au gré du vent. Au total, près de 12 milliards de milliards de Bq qui s'échappent dans l'environnement, soit 30 000 fois l'ensemble des rejets radioactifs atmosphériques émis en une année par les installations nucléaires alors en exploitation dans le monde à cette période.

La zone contaminée par le césium 137 s'étend sur près de 191 000 km^2. Environ 45% des rejets se sont déposés sur le territoire de l'ex-URSS, 39% dans le reste de l'Europe et 14% sur les autres continents et les océans.

Les autorités compétentes ont établi une cartographie des zones de contamination, selon la densité de césium 137 déposé en Ukraine :

- Zone I : >1 480 $kBq.m^{-2}$
- Zone II : 555- 1 480 $kBq.m^{-2}$
- Zone III : 185- 555 $kBq.m^{-2}$
- Zone IV : 37- 185 $kBq.m^{-2}$

La **figure 10** représente une carte des dépôts de ^{137}Cs en Bq/m^2 en Europe en mai 1986.

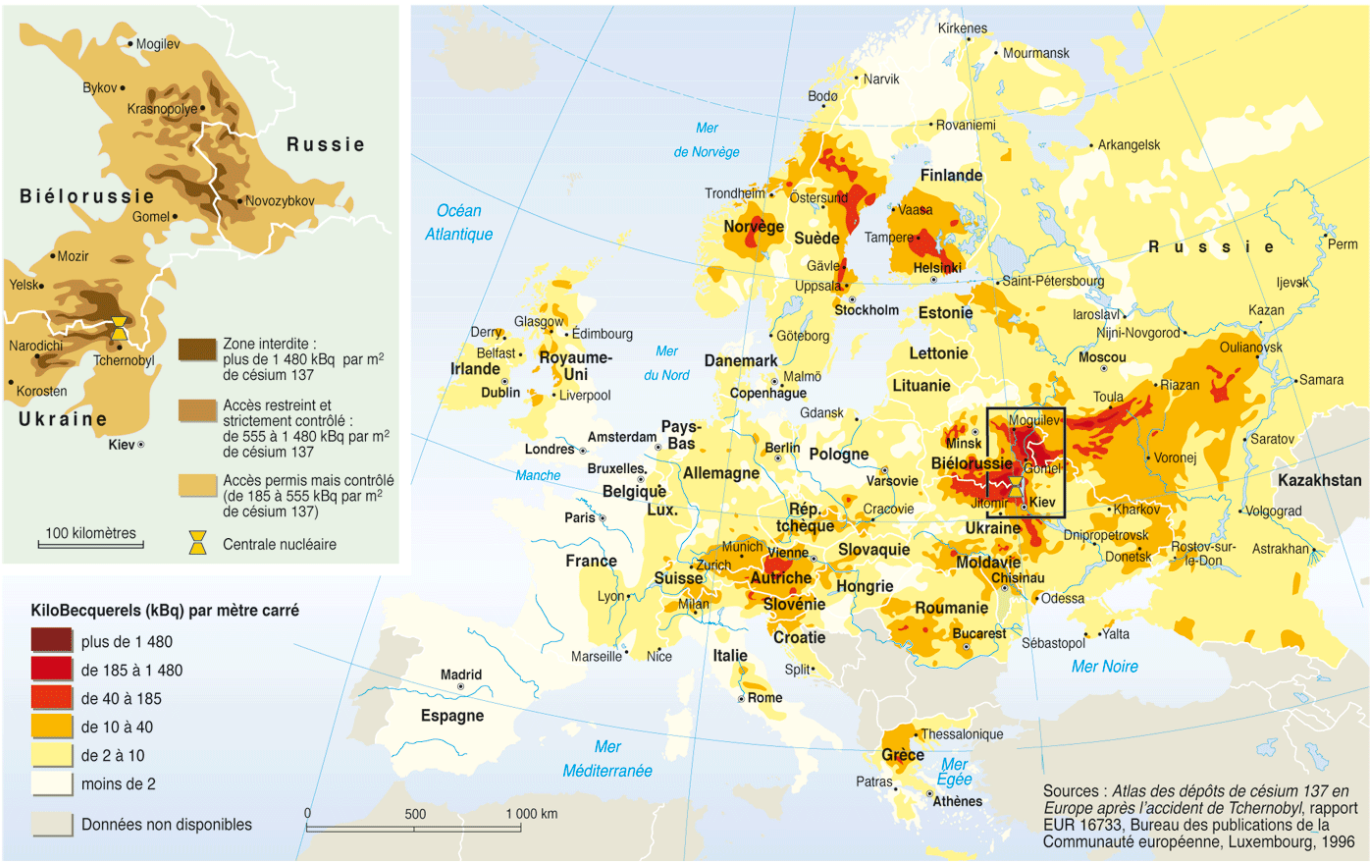


Figure 10 Carte des dépôts de césium 137 en Europe après l'accident de Tchernobyl

Une étude réalisée chez des habitants vivants en zone II, dans la ville de Christinovska a permis d'obtenir des valeurs de référence dans le cadre d'une contamination interne, en étudiant les doses ingérées quotidiennement dans la fin des années 90 (cf « 3. Exposition des populations au césium 137 ») **(Handl et al. 2003)**.

iii. Goiânia, Brésil – septembre 1987

Accident de pollution radioactive s'étant produit en septembre 1987, à 200 km au nord de Brasilia. Un vieil appareil de radiothérapie contenant une source de césium 137 (présente sous forme de chlorure de césium), aisément dispersable, oublié dans un hôpital laissé à l'abandon a été retrouvé par des inconnus. Pensant tirer profit de leur découverte, ils ont ôté la source de la tête d'irradiation et l'ont rapportée chez eux pour la démonter. Après avoir brisé la capsule entourant la source, les différents éléments ont été revendus à un ferrailleur. La source radioactive a été ainsi manipulée et déplacée, et a directement irradiée et contaminée de nombreuses personnes (une vingtaine d'hospitalisations, parmi lesquelles quatre sont décédées), et également contaminé durablement l'environnement. Sur 44 TBq dispersés, 7 TBq sont encore persistants dans la nature. Des mesures réalisées sur le terrain en 2002 détectaient une activité maximale de 175 $kBq.kg^{-1}$ de terre **(International Atomic Energy Agency. Department of Research and Isotopes. 1998; Yoshimura et al. 2001; Anjos et al. 2002)**.

iv. Fukushima, Japon - 2011

Le 11 mars 2011, un séisme de magnitude 8,9 sur l'échelle de Richter touche la côte nord-est japonaise, engendrant la formation d'un tsunami pénétrant jusqu'à 10 km à l'intérieur des terres. Le tsunami détruit partiellement ou totalement de nombreuses villes et installation, dont la centrale nucléaire Fukushima-Daiichi située en bordure du Pacifique, à 200 km au nord-est de Tokyo. La conjoncture de ces évènements naturels d'une ampleur remarquable dévaste le site, entraînant la perte de refroidissement des cœurs des réacteurs et de plusieurs piscines d'entreposage de combustibles usés. Le défaut de refroidissement des réacteurs induit des fusions partielles des cœurs, tandis que des explosions, dues à la production d'hydrogène au cours de la dégradation des combustibles, détériorent les bâtiments des réacteurs 1 à 3.

A partir du 12 mars 2011, et de façon plus modérée mais continue pendant plusieurs semaines, des rejets massifs de substances radioactives se produisent. Ainsi, près d'un mois après l'accident, des mesures effectuées dans l'est du pays, montrent que les dépôts en césium 137 s'élèvent à plus de 1 000 MBq.km^{-2} **(Yasunari et al. 2011)** (**figure 11**).

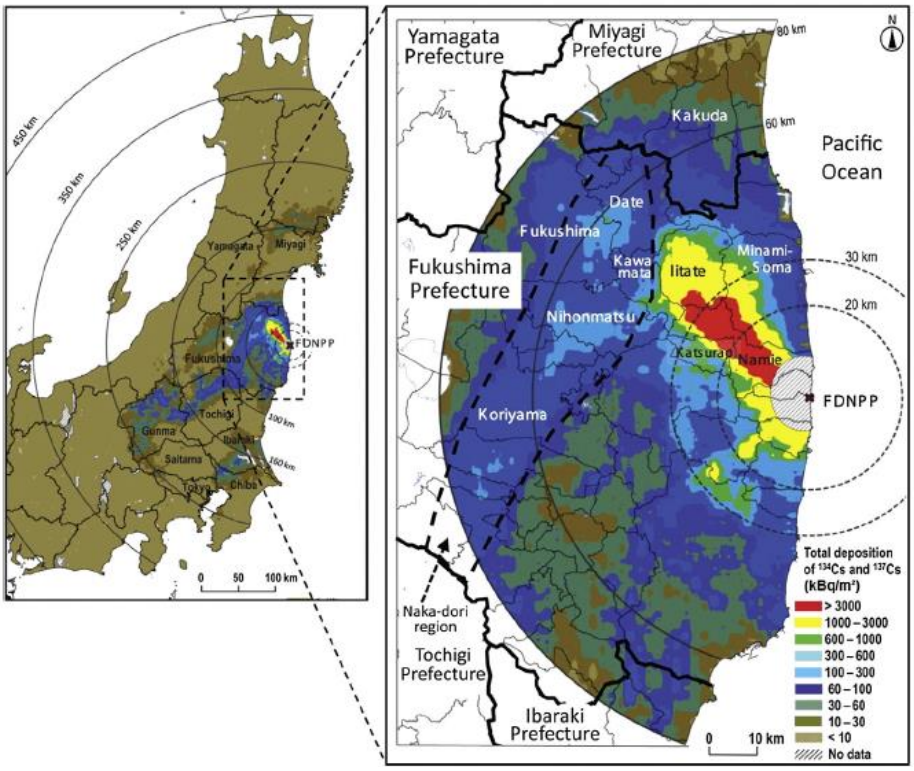


Figure 11 Carte des dépôts de radiocésium après l'acident nucléaire de Fukushima *(Yoshida 2012)*

C. Activités industrielles et militaires

Entre 1945 et 1980, plusieurs centaines d'essais nucléaires ont été effectués, conduisant la dissémination dans l'environnement d'une quantité de césium 137 estimée à près de 9,6 x 10^{17} Bq.

Les rejets « de routine » par les installations nucléaires en fonctionnement normal, rejet de césium 137 résultant des opérations de retraitement du combustible, participent également –à moindre mesure- à une contamination environnementale.

A titre d'exemple, les rejets de césium 137 d'une usine de retraitement de la Hague s'élevaient à 1,3 x 10^{12} Bq en 1999.

3. Exposition des populations au césium 137

Suite aux rejets et à la dispersion de césium 137 dans l'environnement, les voies d'exposition majeures des populations au césium 137 sont l'irradiation externe et l'ingestion.

Les populations vivant sur les territoires contaminés sont exposées quotidiennement aux émissions γ de rayonnements ionisants *via* une exposition externe. En effet, de par ses propriétés physico-chimiques et radiologiques, le césium dispersé dans l'environnement fait de ce radioélément un contaminant durable. L'irradiation externe occupe une place non négligeable dans les effets toxiques de cet élément.

Outre l'exposition externe, les voies d'expositions internes au ^{137}Cs sont l'ingestion, l'inhalation et la contamination par blessure. Ces 2 dernières voies concernent principalement les travailleurs du nucléaire. L'ingestion de denrées contaminées constitue la voie majeure d'exposition d'un point de vue quantitatif.

Le césium 137 se dépose sur le sol, et migre peu, particulièrement en présence d'argile. Il se concentre principalement sur la couche superficielle du sol. Il se retrouve dans la litière des forêts et dans les milieux aquatiques.

Le césium entre dans la chaîne alimentaire animale et humaine *via* la consommation de denrées contaminées comme le lait, viandes, champignons, et des mesures réalisées sur des

produits alimentaires en Biélorussie entre 1986 et 1989 en attestent (**Table 6**). Des années encore après cet accident, le lait reste la principale source de contamination, et contribue à plus de 50% de la moyenne de prise de césium 137 **(Travnikova et al. 2001)**.

Aliments	1986	1989
Lait	37 000	300
Légumes verts	52 000	220
Légumes racines	1 300	220
Viandes	3 700	3 000
Poissons	7 400	560
Champignons	7 500	560

Table 6 Teneur en césium (134 + 137) de produits de la consommation à Korma, Biélorussie, en $Bq.kg^{-1}$

L'étude de **Handl et al. (2003)** a permis de mesurer les quantités de radioéléments absorbées par les habitants de la ville de Christinovka, zone contaminée en Ukraine du nord (en zone II, zone où l'activité dépasse les 555 kBq/m^2). Cette étude précise que la contamination au césium 137 passe à 95% par la consommation de champignons et de baies sauvages. La consommation de lait ou autres produits agricoles représente entre 3-5% de la dose ingérée. La **Table 7** présente en fonction des aliments consommés, l'activité moyenne du produit, et l'activité ingérée en zone contaminée dans la région de Tchernobyl. Parmi les aliments les plus contaminés, on retrouve majoritairement les champignons.

Aliments	Consommation quotidienne (kg de produit frais)	Activité moyenne en ^{137}Cs (Bq kg^{-1} de produit frais)	Ingestion quotidienne de ^{137}Cs (Bq)
Lait	1,000	54	54
Pain	0,400	0,3	0,1
Pommes de terre	0,500	9,1	4,5
Navets	0,050	3,8	0,2
Choux	0,050	1,5	0,1
Fruits	0,400	4,7	1,9
Viande	0,200	20	4,0
Poisson	0,050	12	0,6
Œufs	0,014	2,5	0,04
Baies sauvages	0,011	2600	28
Champignons	0,010	200000	2000
Total hors champignons	2,801		**96**
Total champignons inclus	2,811		**2096**

Table 7 Ingestion quotidienne de denrées contaminées au césium 137 et activité moyenne en césium 137 de produits alimentaires retrouvés en zone contaminée autour de Tchernobyl *(Handl, Beltz et al. 2003)*

Différents travaux montrent qu'il existe une corrélation entre le niveau de césium contenu dans la ration alimentaire, l'ingestion quotidienne de césium et la charge corporelle **(Takatsuji et al. 2000; Handl et al. 2003)**.

D'autres investigations ont permis de mesurer la contamination interne en réalisant des examens corps entier chez des enfants vivants en territoires contaminés (Bryansk Oblast, province de Russie), entre 1991 et 1996 **(Hoshi et al. 2000)**. Les activités retrouvées pouvaient aller de 25 à 250 $Bq.kg^{-1}$.

Une étude réalisée en Finlande, en réalisant des dosages dans les urines, a montré que les activités mesurées pouvaient varier de 2 à 15 $kBq.kg^{-1}$ **(Puhakainen et al. 2003)**.

Ainsi, l'ingestion chronique de césium 137 dépend de la location géographique et du régime alimentaire. On retiendra que les études menées pour estimer les quantités de radioélément ingérées varient de 20 Bq à plus de 2 000 Bq **(de Ruig et al. 1992; Handl et al. 2003)**.

4. Biocinétique du césium 137

Le césium se comporte de la même manière que son analogue chimique qu'est le potassium, qu'il soit radioactif ou stable, avec des différences quantitatives cependant.

Le potassium traverse les membranes cellulaires plus rapidement que le césium, et sa présence dans le compartiment extra-cellulaire inhibe l'entrée de césium dans les cellules musculaires lisses.

A. Absorption du césium 137

Qu'il soit inhalé ou ingéré, l'absorption du césium au niveau pulmonaire ou gastro-intestinal est très importante. Le césium passe facilement la barrière intestinale. Chez l'animal, 98% du césium ingéré peut être absorbé en 1 heure. Chez l'homme, l'absorption est également quasi-totale. Cependant, le césium incorporé dans l'alimentation peut se complexer avec des ligands organiques, et ainsi le taux d'absorption est moindre **(Nesterenko et al. 2004)**. Malgré les différences qui peuvent exister, la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) a adopté pour ses calculs de doses, un passage gastro-intestinal de 100% pour la nourriture solide ou liquide, pour les populations de tous âges (modèles dosimétriques de la CIPR, validés 1991). A noter que l'absorption gastro-intestinale dépend non seulement du type d'aliment mais également de la manière dont il est préparé **(Raaf et al. 2004)**.

Des volontaires ayant consommé du gibier contaminé par du césium 137 et 134 suite à l'accident de Tchernobyl, présentaient un taux moyen d'absorption de 78% **(Henrichs et al. 1989)**. La forme physico-chimique du césium ainsi que la composition des rations alimentaires sont des paramètres importants pouvant faire varier le taux d'absorption.

B. Distribution – rétention du césium 137

Une fois que le césium quitte le compartiment sanguin, il est admis qu'il se distribue de façon homogène dans l'organisme. Le césium est incorporé dans le compartiment intra-cellulaire par transport actif, notamment grâce aux canaux potassium, et les pompes Na^+/K^+-ATPase **(Leggett et al. 2003)**. La quantité de potassium au sein de l'organisme influe sur la rétention du césium dans les compartiments cellulaires **(Wasserman et al. 1961; Sato et al. 1997)**.

Il a été montré chez la souris que le césium passe librement la barrière placentaire et se répartit de façon quasi uniforme entre le fœtus et la mère **(von Zallinger et al. 1998)**. Concernant le passage du césium à travers le lait maternel, selon des travaux réalisés chez une rate allaitante contaminée au césium par voie orale (dose de 0.4 – 19.7 µg/Cs/kg), une fraction se retrouvait dans le lait **(Sundberg et al. 1991)**. Des études réalisées chez des suédoises ayant été contaminées suite aux retombées de Tchernobyl montre qu'une fraction de césium ingérée *via* l'alimentation se retrouve dans le lait maternel, pouvant ainsi entraîner une exposition de l'enfant **(Fabbri et al. 1994; Johansson 1998; Thornberg et al. 2000)**. Les modèles de prédictions montrent qu'un maximum de 20% de l'activité ingérée de césium 137 peut être transféré dans le lait maternel **(Ann ICRP, 2001)**.

Cependant, les concentrations relatives de césium sont plus hétérogènes que celles de son analogue chimique potassique, comme décrit dans la **Table 8**. Ainsi, la concentration retrouvée dans l'aorte est 4,5 fois plus forte que dans le muscle, alors que pour le potassium elle est deux fois plus faible, en prenant comme référence la concentration dans le muscle strié.

	Césium	Potassium
Muscle	**1**	**1**
Aorte	4,5	0,5
Surrénales	2,3	0,3
Foie	2	1
Rate	2	
Poumon	1,3	0,7
Reins	1,1	0,7
Testicules	1	0,7
Ovaires	0,5	0,5
Cerveau	0,1	1
Jéjunum	0,06	0,6
Colon	0,03	0,4

Table 8 Concentrations relatives du césium et du potassium stables dans divers tissus et organes, en prenant comme référence la concentration du muscle strié. *Source : Le Césium – de l'environnement à l'Homme*

Des travaux de 2003 réalisés suite à des autopsies dans la population de Gomel (Biélorussie), une ville fortement impactée par l'accident de Tchernobyl, rapporte que les concentrations en césium 137 mesurées sont plus importantes chez les enfants par rapport aux adultes (figure 12) **(Bandazhevsky 2003)**.

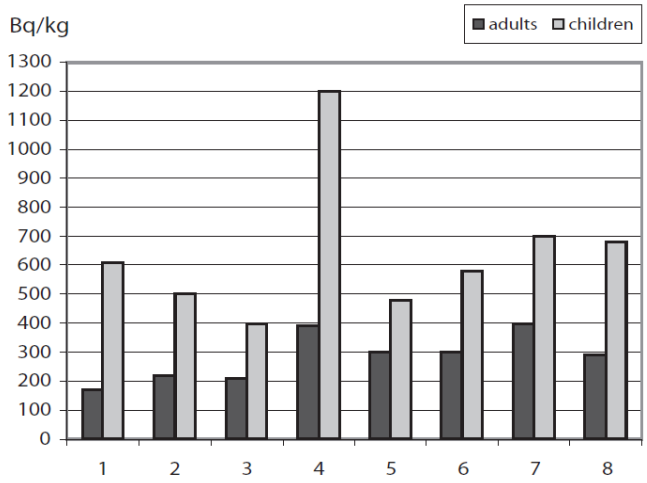


Figure 12 Accumulation radio-isotopes dans divers organes chez des enfants et des adultes décédés en 1997 ; 1 : myocarde, 2 : cerveau, 3 : foie, 4 : thyroïde, 5 : reins, 6 : rate, 7 : muscle squelettique, 8 : intestin *(Bandazhevsky 2003)*

Une étude réalisée chez l'animal contaminé par ingestion au césium 134, montre que le césium se retrouve de façon importante dans de nombreux tissus avec des concentrations plus importantes au niveau des muscles et également au niveau des reins, du pancréas et des glandes parathyroïdiennes **(Skuterud et al. 2004)**.

Une étude de **Tourlonias et al (2010)**, dont l'objectif était d'étudier la distribution du césium après ingestion, dans les différents organes et tissus du rat, montre également que tous les organes contiennent des niveaux de césium similaires, sauf pour les muscles striés et la thyroïde. Dans ce travail, deux modèles ont été utilisés : un modèle de rat adulte, et un modèle de rat juvénile (avec un groupe contaminé de la naissance au sevrage, et un autre groupe contaminé à la fin de la période de lactation). Les rats ingèraient du césium 137 *via* l'eau de boisson, à la concentration de 6 500 $Bq.L^{-1}$. En estimant qu'un animal boit en moyenne 30-35 mL par jour, cela représente une ingestion quotidienne de 80 Bq/jour (après le sevrage) à 200 Bq/jour par animal (adulte), ce qui est en adéquation avec les estimations des quantités de césium ingérées quotidiennement par les populations vivant sur les territoires contaminés. Cette étude est également en accord avec des observations faites chez l'homme où il a été montré que l'accumulation du césium dépend de l'âge, du sexe et du poids **(Tourlonias et al. 2010)**.

C. Excrétion-élimination du césium

Le modèle de biocinétique développé par **Leggett** montre que le césium est éliminé après ingestion à 86% dans les urines et à 14% dans les selles **(Leggetts et al. 2003)**. L'étude de **Henrichs** sur l'élimination du césium par l'organisme montre que celle-ci se fait en deux temps : près de 6% de la charge corporelle est éliminée dès le premier jour, et le % restant est éliminé plus lentement **(Henrichs et al. 1989)**.

Chez l'Homme, la période biologique[4] du césium varie entre 50 et 150 jours. En effet, différents paramètres influencent cette rétention : le sexe, la masse corporelle et l'âge. Chez l'homme adulte, cette période est de 97 jours, chez la femme elle est de 70 jours. Du fait de la prise de poids au cours de la croissance, la période biologique augmente avec ce paramètre : 34 jours en moyenne pour un enfant de 5 ans *vs* 97 jours pour un adulte **(Leggett et al. 2003)**.

La **figure 13** présente de façon schématique le modèle de biocinétique du césium 137, adapté du modèle de **Leggett**.

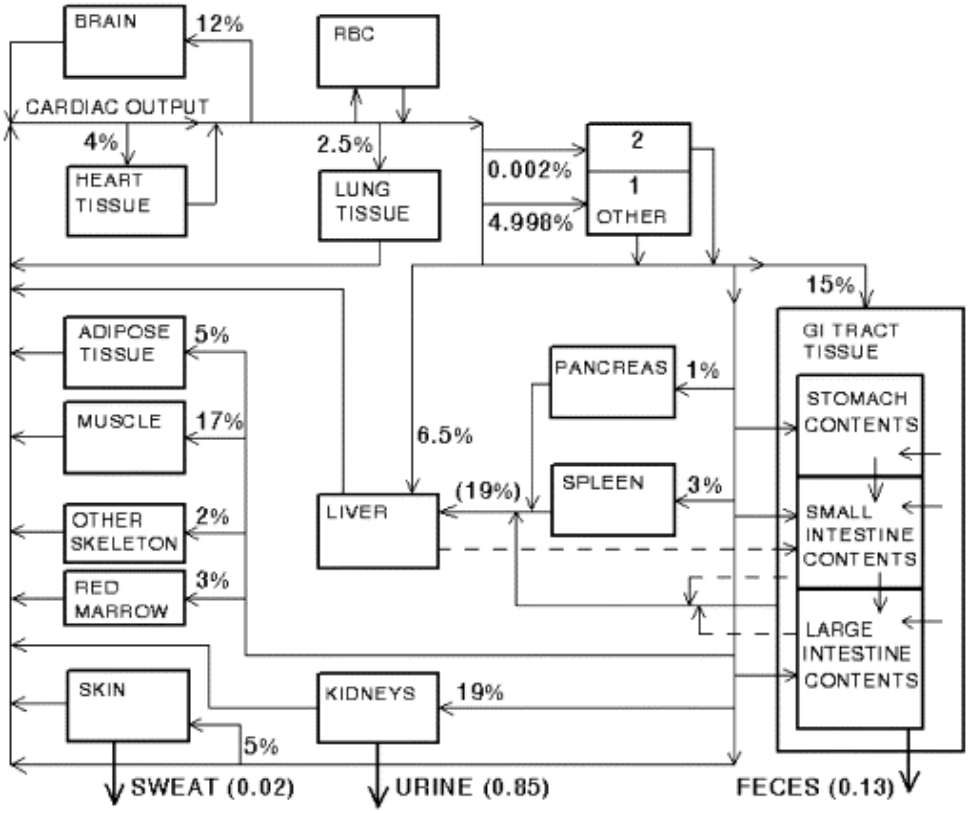


Figure 13 Modèle de biocinétique du cesium. Les flèches pleines représentent les flux plasmatiques, les flèches discontinues d'autres flux *(Leggett, et al. 2003)*

[4] La période biologique désigne le temps au bout duquel la moitié de la substance absorbée est éliminée de l'organisme

5. Toxicité et effets physiologiques du césium

La toxicité chimique du césium est faible. Selon sa forme chimique, la DL 50[5] du césium stable (^{133}Cs) varie entre 800 et 2000 mg/kg **(United States Agency for Toxic Substances and Disease Registry and Syracuse Research Corporation, 2004)**. Ainsi, la toxicité du césium 137, résulte essentiellement de ses propriétés radiologiques, par son caractère d'émetteur de type β et γ, faisant de lui un élément radiotoxique.

Comme nous l'avons précisé dans la section précédente, la distribution de cet élément est *relativement* homogène. Les effets d'une contamination par le ^{137}Cs sont donc considérés comme analogues à ceux d'une irradiation globale.

Cependant, quelques études font état d'effets induits par une exposition au ^{137}Cs à fortes doses. Concernant les effets d'une exposition chronique à faibles doses sur le long terme par ce radioélément, il existe très peu de données disponibles sur la toxicité du césium 137, mis à part quelques données épidémiologiques recueillies après l'accident de Tchernobyl.

Dans cette cinquième partie, nous aborderons tout d'abord les effets recensés à ce jour suivant une exposition à forte dose de césium 137 et ensuite une partie consacrée aux effets existants suite à une exposition à faible dose de césium 137, aussi bien des études menées chez l'animal que chez l'Homme (quand elles existent).

[5] Dose Létale 50 : indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance, correspond à la dose à laquelle 50% de la population exposée décède

A. Effets d'une exposition à forte dose de césium 137

i. Effets cancéreux

Une des conséquences les plus connues de l'accident de Tchernobyl est l'augmentation de l'apparition de cancers, et notamment ceux de la thyroïde, chez les enfants, et imputables aux iodes radioactifs – ce qui n'est pas le propos ici.

Le risque de leucémie est associé aux radiations ionisantes, largement décrit chez les survivants des explosions des bombes atomiques d'Hiroshima et Nagasaki **(International Atomic Energy Agency. Department of Research and Isotopes. 1998; United Nations. Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 2000)**. L'étude de l'incidence des leucémies chez les victimes de l'accident de Tchernobyl n'a pas permis de mettre en évidence une relation entre la dose estimée, la contamination du sol et le risque de développer une leucémie. Cependant, la faible puissance statistique des études est un problème récurrent dans les études épidémiologiques sur les conséquences sanitaires post-accidentelles. Cette absence de relation semble se confirmer chez les enfants (contaminés *in utero* ou non) et les adultes des territoires contaminés **(Rodel et al. 2004)**.

Plusieurs études réalisées chez le chien de race Beagle suite à une injection en intraveineuse de ^{137}CsCl (chlorure de césium) à différentes concentrations (de 36 à 140 MBq de césium par kg de poids corporel) montrent que les chiens développent des tumeurs malignes et bégnines au niveau des cavités nasales et au niveau du foie **(Nikula et al. 1995; Nikula et al. 1996)**.

ii. Effets immuno-modulateurs

Chez le rat, une injection de 1 GBq.kg^{-1} intrapéritonéale d'une solution d'un mélange de ^{137}Cs et ^{90}Sr entraîne la mort de 50% des animaux au bout de 30 jours **(Thomas et al. 1970)**. Ce temps pour atteindre la DL varie en fonction de la dose et du sexe : il augmente quand la dose diminue et il est également augmenté chez les femelles.

Les études menées chez le Beagle montrent des atteintes sévères suite à l'injection en intraveineuse de ^{137}CsCl, et notamment une atteinte du système hématopoïétique dans les jours suivants l'injection, avec une diminution très importante du taux de globules blancs, des neutrophiles et des lymphocytes par rapport aux animaux non injectés, jusqu'à des hémorragies et/ou septicémies **(Redman et al. 1972; Nikula et al. 1995; Nikula et al. 1996)**.

Lors de l'accident de Goiâna de 1987, 14 personnes ont été exposées à la source de ^{137}CsCl contenu dans la source d'irradiation. L'exposition à forte dose de radiocésium a ainsi entraîné un syndrome d'aplasie médullaire, syndrome observé classiquement après une irradiation aiguë à des rayonnements ionisants à forte dose **(Brandao-Mello et al. 1991)**.

iii. Effets repro-toxiques

Le système reproducteur représente aussi une cible d'une exposition aigue forte dose de césium 137. Chez la souris, il a été montré qu'une exposition à forte dose *via* l'eau de boisson (14,8 kBq.mL^{-1}) pendant plusieurs générations affecte la reproduction dès la deuxième génération, accompagnée d'une atrophie testiculaire. Même pour des doses dix fois plus faibles (1,48 kBq.mL^{-1}), les souris présentent des troubles de la fonction de reproduction : moins de petits par portées, croissance corporelle significativement diminuée comparée aux animaux témoins. Notons cependant qu'à la concentration de 0,148 kBq de ^{137}CsCl, les animaux ne présentent aucune lésion.

Dans les travaux réalisés sur les chiens Beagle, injectés en IV à des doses allant de 36 à 140 MBq de Cs par kg de poids corporel, les auteurs rapportent une altération de l'épithélium germinal ainsi qu'une azoospermie **(Nikula et al. 1995; Nikula et al. 1996)** (**figure 14**).

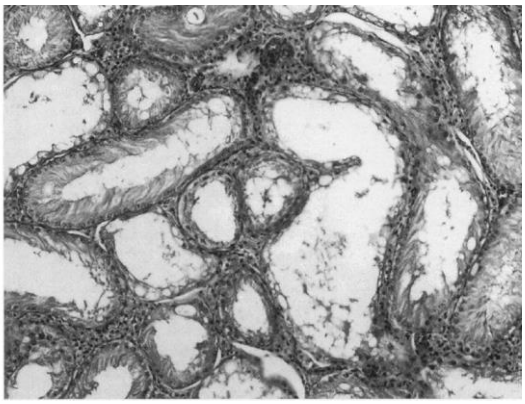


Figure 14 Atrophie de l'épithélium germinal, azoospermie complète, chez le Beagle injecté par voie intra-veineuse au ^{137}Cs (grossissement x120), *(Nikula et al. 1995)*

Les hommes exposés à fortes doses de césium lors de l'accident de Goiâna présentaient une diminution de la fertilité, avec une réduction importante du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité **(Brandao-Mello et al. 1991)**.

iv. Effets hépa-rénaux toxiques

A forte dose, le césium possède des effets hépatotoxiques. Les études chez l'animal rapportent une augmentation du taux d'ALAT[6] sérique, témoignant d'une atteinte hépatique, ainsi que des dégénérescences au niveau du foie et des affections rénales **(Stojadinovic et al. 1966; Nikula et al. 1995; Nikula et al. 1996)**. Des études sur les Liquidateurs de Tchernobyl, qui sont intervenues pour nettoyer les zones les plus fortement contaminées dans un rayon de 30 km autour du réacteur, et sur les patients irradiés lors de l'accident nucléaire au Brésil rapportent aussi ces effets d'une telle exposition, avec une augmentation des ALAT et ASAT[7] **(Brandao-Mello et al. 1991; Kern et al. 2000)**.

[6] ALAT : Alanine aminotransférase

[7] ASAT : Aspartate aminotransférase

v. Autres effets

Les études épidémiologiques réalisées sur les Liquidateurs de Tchernobyl font également état qu'une exposition à forte de dose de césium cause des troubles de la minéralisation osseuse pouvant entraîner une ostéoporose **(Kharchenko et al. 1994; Rozhinskaia et al. 1994)**, ainsi que l'apparition de lésion cérébrales au niveau sub-cortical **(Zhavoronkova et al. 1996)**.

Le suivi à long terme de cette population ne permet cependant pas d'établir un lien de causalité entre la quantité de césium ingérée et les pathologies observées.

La **Table 9** reprend de façon très globale les différents effets observés suite à une exposition à fortes doses de césium 137.

Effets observés à FORTES doses de césium 137	
Chez l'animal	**Chez l'Homme**
Insuffisance médullaire	Insuffisance médullaire
Arrêt des fonctions reproductives	Baisse de la fertilité
Hépatotoxicité	Hépatotoxicité
Tumeurs bégnines et malignes	Atteintes du système digestif
	Lésions cérébrales
	Troubles de la minéralisation osseuse

Table 9 Effets observés suite à une exposition à fortes doses de césium 137 *(Lestaevel et al. 2010)*

B. Effets d'une exposition à faibles doses de ^{137}Cs

La contamination durable de l'environnement engendrée par les accidents nucléaires, les rejets de routine entraîne une exposition des populations. Ces dernières sont chroniquement exposées à de faibles doses de radioéléments principalement via l'alimentation.

Les conséquences d'une exposition à faibles doses sur la santé de l'Homme et les risques sanitaires encourus sont encore insuffisamment documentés. Cependant, des études expérimentales menées au Laboratoire de RadioTOXicologie expérimental (LRTOX) dans des conditions de contamination à faibles doses, dans le cadre de situations post-accidentelles, ont mis en évidence qu'une telle exposition pouvait engendrer des modifications de certaines fonctions physiologiques chez les rongeurs (programme ENVIRHOM de l'IRSN). Chez l'homme les études épidémiologiques font également état de perturbations, et semblent indiquer une sensibilité accentuée chez les enfants.

Cette partie propose une revue de la littérature des données actuellement disponibles, aussi bien chez l'animal que chez l'homme.

i. Effets néphrologiques

Les reins sont les organes majeurs impliqués dans l'excrétion du césium. Ainsi, **Romanenko et al** décrivent une augmentation du cancer du rein dans la population ukrainienne. De plus, une exposition à faibles doses de césium entraîne également des lésions au niveau de la vessie, et des cystites chroniques proliératives **(Calleja et al. 1999; Romanenko et al. 2000)**.

ii. Effets sur le système immunitaire

Des données humaines montrent qu'une exposition à de faibles quantités de césium conduit à un déficit immunitaire, et plus particulièrement chez les enfants. Il est rapporté une baisse des lymphocytes B, une augmentation des lymphocytes T, ainsi qu'une baisse de l'activité de phagocytose des neutrophiles, pour des valeurs de contamination comprises entre 2,5 Bq et 32,3 Bq par jour **(Titov et al. 1995; Mel'nichenko et al. 1999; DeVita et al. 2000)**.

De façon expérimentale l'étude de **Bertho et al.** montre que des souris exposées au césium 137 à la concentration de 20 kBq.L^{-1} *via* l'eau de boisson ne présentent pas de modifications des populations lymphocytaires, par rapport aux animaux témoins (**figure 15**).

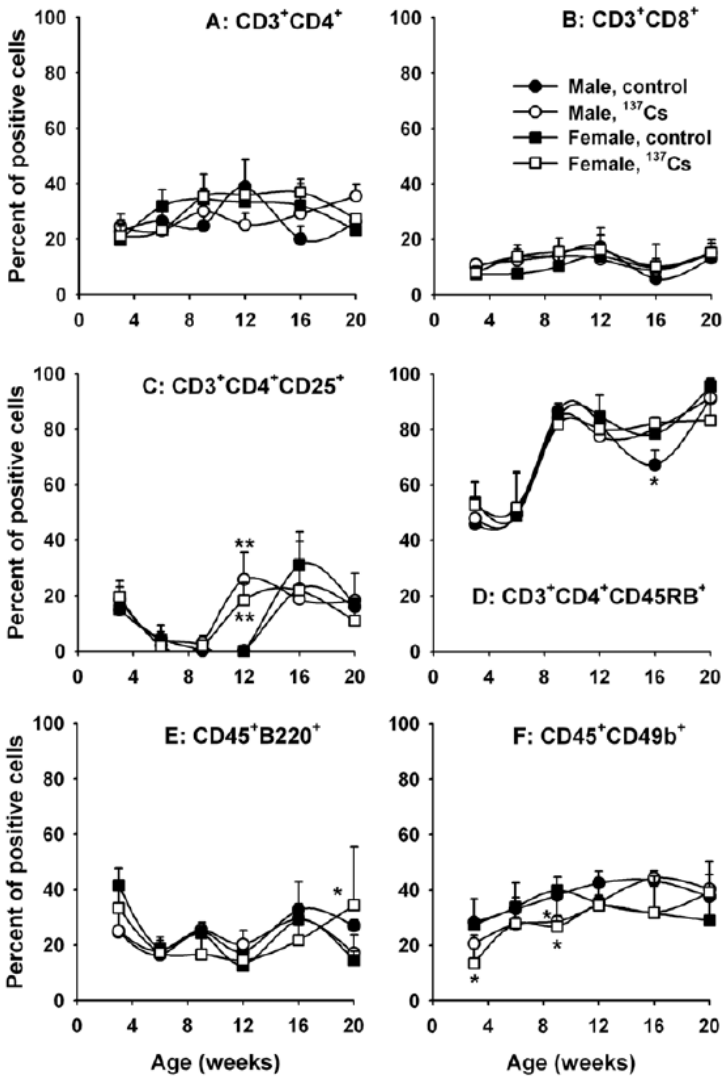


Figure 15 Analyse phénotypique des cellules sanguines circulantes après exposition au ^{137}Cs à 20 kBq.L^{-1}. A : Lymphocytes T helper ; B : LT cytotoxiques ; C : LT régulateurs ; D : LT mémoire ; E : LB ; F : cellules NK

(Bertho et al. 2011)

La conclusion de ce travail est qu'une exposition à faible dose de césium 137 n'influe pas sur le système immunitaire des souris **(Bertho et al. 2011)**.

iii. Effets sur le système nerveux

Une étude réalisée chez le rat contaminé via l'eau de boisson pendant 9 mois à la concentration de 6 500 $Bq.L^{-1}$, soit 150 Bq/jour ingéré en moyenne par un rat, a montré que le césium traverse librement la barrière hématoencéphalique, et se distribue de façon hétérogène dans les différentes structures cérébrales (notamment au niveau du tronc cérébral). Les auteurs ont remarqué des perturbations passagères du cycle veille/sommeil ainsi que de l'activité encéphalographique **(Lestaevel et al. 2006)**. Cependant, dans les mêmes conditions expérimentales, le césium n'induit pas de modifications comportementales (tests de locomotion et mémoire) **(Houpert et al. 2004)**.

Dans cette dernière étude, les auteurs se sont également intéressés à l'étude de deux neurotransmetteurs dans différentes structures cérébrales (noyaux gris centraux) : la dopamine et la sérotonine, dont le métabolisme est perturbé en cas d'irradiation externe, même à des doses modérées (à 4 Gy) selon **Foulon et al. (1999)**. Les rats contaminés sur une période de 1 mois à 6 500 $Bq.L^{-1}$ ne présentent pas de différence de niveaux de ces neurotransmetteurs par rapport aux rats témoins non contaminés **(Houpert et al. 2004)**.

Chez l'homme, une étude réalisée entre 1995 et 1998 sur une population vivant à 150 km de la centrale de Tchernobyl, met en évidence l'apparition de signes de neurotoxicité. Les auteurs ont établi un lien entre une exposition au césium 137 et des modifications du système nerveux central, avec l'apparition de désordres neurologiques : troubles mentaux, diminution de la mémoire cognitive, ralentissement psychomoteur **(Hildebrandt et al. 2003)**.

Le suivi à long terme des Liquidateurs (après 12 et 14 ans d'exposition) a permis de mettre en évidence une augmentation de l'incidence de pathologies oculaires, en l'occurrence la cataracte **(Worgul et al. 2007)**.

iv. Effets « gastro-intestinaux »

Des rats exposés pendant 3 mois via l'eau de boisson (150 Bq.jour^{-1} par animal), ne présentent pas de modification de l'architecture des cryptes et des villosités intestinales (**figure 16**).

Non-contaminés Contaminés au ^{137}Cs

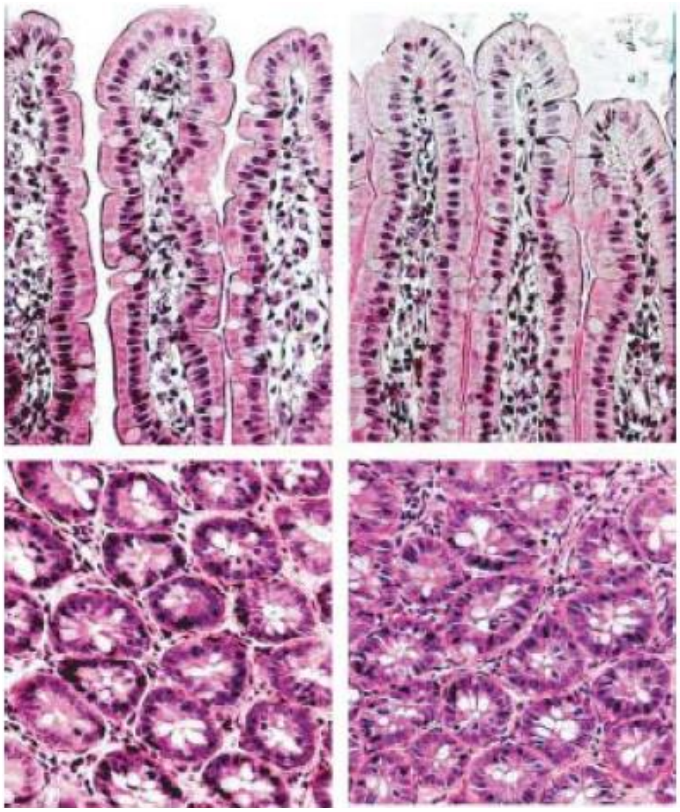


Figure 16 Une contamination au césium 137 n'entraîne pas de modification histologique de l'épithélium gastro jéjunum de rats (coloration HES) (grossissement x200) *(Dublineau et al. 2007)*

Les auteurs observent un maintien de l'intégrité épithéliale, ainsi que des paramètres trans-épithéliaux (pas de modification de la conductance des tissus). En revanche, des effets contradictoires concernant l'expression génique de marqueurs de l'apoptose sont observés.

Une augmentation de l'expression de l'ARNm des gènes Fas/FasL[8] et une diminution des cellules apoptotiques au niveau de la muqueuse intestinale ont été rapportés **(Dublineau et al. 2007)** (**figure 17**).

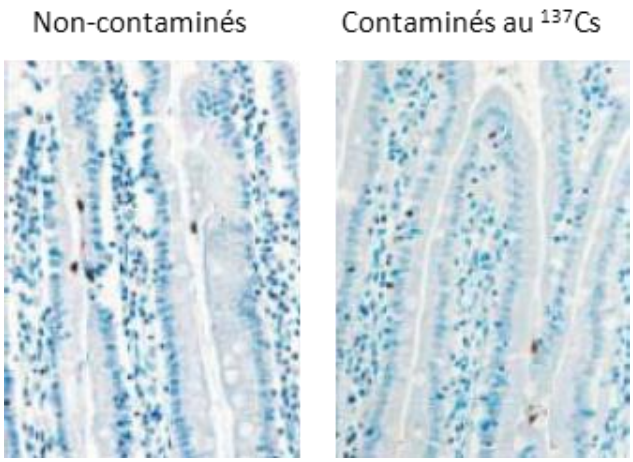


Figure 17 Etude des cellules apoptotiques au niveau de l'épithélium jéjunal par la technique TUNEL.
Le marquage marron indique une cellule « positive » à l'apoptose (grossissement x400)
(Dublineau et al. 2007)

Toutefois, un marquage Ki67 réalisé au niveau des coupes ne permet pas de mettre en évidence une différence de prolifération cellulaire (au niveau des cryptes) entre les animaux exposés ou non.

Concernant les paramètres inflammatoires, l'étude de l'infiltrat de cellules inflammatoires (neutrophiles), et de l'expression génique de cytokines et de chimiokines ne révèle pas de différence entre les animaux contaminés ou non au césium 137 **(Dublineau et al. 2007)**. Dans cette même étude, les auteurs ne mettent pas en évidence de différence fonctionnelle de l'intestin entre les animaux contaminés ou non.

[8] Fas/FasL : de façon très simplifiée, Fas est une protéine transmembranaire appartenant à la famille du TNFα, pouvant induire l'apoptose cellulaire.

De plus, l'augmentation concomitante de l'expression des messagers de l'IFN-γ et de l'IL-10 suggère que l'équilibre Th1/Th2 n'est pas perturbé par une telle exposition au césium.

v. Effets sur le métabolisme du cholestérol et de la vitamine D

Des rats exposés au ^{137}Cs à la dose post-accidentelle de 150 Bq/rat/jour pendant 3 mois voient leur taux plasmatique de vitamine D3 (1,25(OH)D_3) significativement diminué par rapport aux animaux témoins : 44,0 ± 7 *vs* 92,4 ± 17,1 pmol/L. Les auteurs montrent également que les niveaux d'expression génique, ou l'activité de certains cytochromes impliqués dans la biosynthèse et le catabolisme de la vitamine D, ainsi que du cholestérol pouvaient être modifiés suite à une contamination chronique au césium 137 **(Souidi et al. 2006; Tissandie et al. 2006; Racine et al. 2009; Racine et al. 2010)** (**figure 18**).

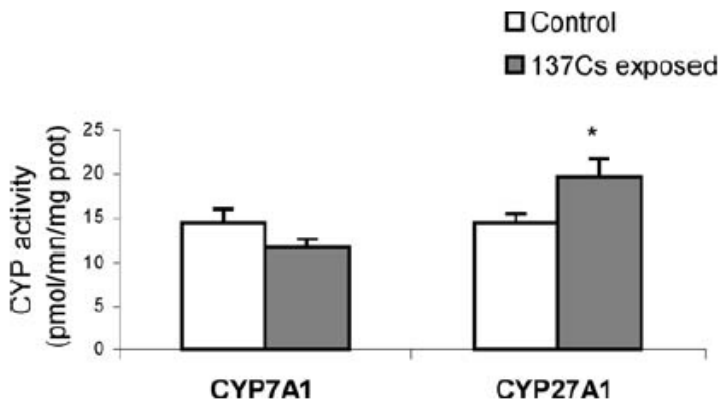


Figure 18 Activité enzymatique de CYP7A1 et CYP27A1 hépatique (métabolisme du cholestérol) après 3 mois d'exposition au césium *(Souidi et al. 2006)*

vi. Effets sur les systèmes reproducteur et hormonal

Des expérimentations réalisées chez des rats exposés pendant 9 mois via l'eau de boisson à la concentration de 6 500 Bq, contaminés *in utéro* et après la naissance, présentent des modifications quant à l'expression génique de certains récepteurs nucléaires au niveau du foie, ainsi que des modifications de concentrations d'hormones stéroïdiennes (augmentation du taux de corticostérone, et diminution du 17β-œstradiol), induites par une exposition à faibles doses de césium 137 **(Grignard et al. 2008; Grignard et al. 2010)**.

vii. Effets sur le système cardiovasculaire

Une étude épidémiologique réalisée chez des enfants habitants la région de Gomel en Biélorussie a montré que ceux-ci présentaient des atteintes cardiaques : troubles à l'ECG et de l'hypertension artérielle, proportionnelle à la charge de césium 137 dans l'organisme **(Bandazhevskaya et al. 2004)**. Cette étude est cependant très controversée par le manque de précision du type de troubles observés à l'ECG, ou les valeurs d'hypertension artérielle (les résultats sont notamment présentés sous forme de % de personnes présentant des troubles).

L'étude de marqueurs biochimiques, physiologiques et moléculaire du système cardiovasculaire réalisée chez des animaux exposés au césium à une concentration environnementale de 6 500 $Bq.L^{-1}$ pendant 3 mois, montre qu'ils présentent des taux plasmatiques de CK et CK-MB[9] significativement augmentés (CK (U/l) : 185,2 ± 25,2 *vs* 121,7± 14,6 ; CK-MB (U/l) : 349,2 ± 42,9 *vs* 230,3 ± 29,6), une modification de l'expression de deux sous unités formant des canaux potassiques ($K_{ir}6$ et SUR) ainsi qu'une baisse significative de

[9] CK et CK-MB : Créatinine Kinase marqueurs de l'atteinte cardiaque

la pression artérielle par rapport aux animaux non contaminés (figure 19), alors que les ECG sont quant à eux normaux (Gueguen et al. 2008).

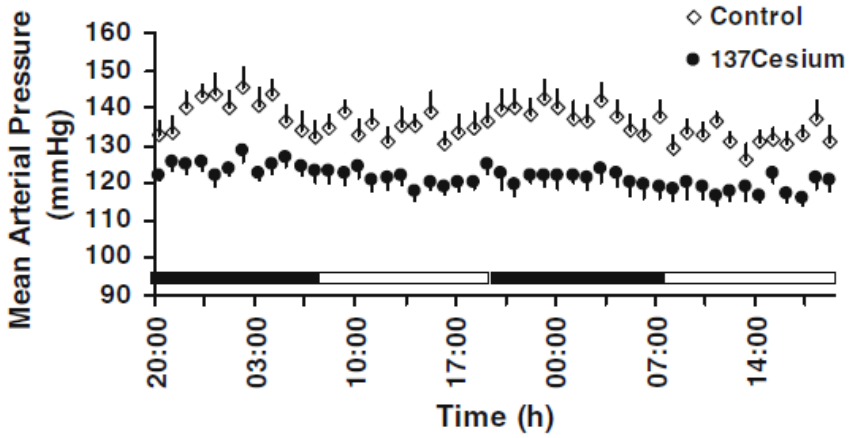


Figure 19 Pression artérielle moyenne (en mmHg) chez des rats exposés chroniquement au ^{137}Cs pendant 3 mois (500 Bq.kg^{-1} dans l'eau de boisson) *(Gueguen et al. 2008)*

L'étude de l'expression génique de paramètres cardiaques chez ces animaux contaminés révèle une diminution significative de CYP1A1, une augmentation significative de l'expression d'ACE[10] et de BNP[11] par rapport aux animaux témoins (Gueguen et al. 2008).

[10] ACE : Angiotensin Converting Enzyme

[11] BNP : Brain Natriuretic Peptide

Aux vues des différentes études réalisées et des résultats qui en découlent (**Table 10**), il apparaît qu'une exposition à de faibles doses de rayonnement ionisant au césium 137 entraîne des modifications subtiles dans les différents systèmes physiologiques étudiés.

Cependant, malgré les différences qui ont pu être mises en évidence entre les animaux témoins et les animaux exposés, celles-ci ne se traduisent pas de façon néfaste sur les organismes étudiés.

Effets observés à FAIBLES doses de césium 137	
Chez l'animal	**Chez l'Homme**
Modifications du métabolisme du cholestérol et des hormones stéroïdiennes	Déficit immunitaire
Baisse du taux de la vitamine D3	Malformations congénitales et fœtales
Diminution de l'apoptose au niveau de l'épithélium intestinal	Cancer du rein
Perturbation de l'EEG	Cystites chroniques
Hypotension	Désordres neurologiques
	Troubles de l'ECG et hypertension

Table 10 Effets recensés après exposition à faibles doses de césium 137 *(Lestaevel et al. 2010)*

III. L'ATHÉROSCLÉROSE

Dans cette troisième partie de l'introduction, nous aborderons plus en détail la pathologie d'intérêt qui a fait l'objet de ma thèse. Nous en donnerons une définition générale avant d'approfondir sur la physiopathologie de l'athérosclérose, en insistant sur les différents marqueurs étudiés.

Nous aborderons également les relations existantes entre une exposition à un rayonnement ionisant et le développement/progression de l'athérosclérose en s'appuyant sur les données de la littérature.

Dans une dernière partie, nous verrons brièvement quels sont les différents modèles animaux actuellement disponibles pour l'étudier.

1. Généralités

A. L'athérosclérose – vieille comme l'Humanité

Bien que considérée comme une pathologie « moderne », l'examen par imagerie (par tomodensitométrie) réalisée sur près de 150 momies[12] vieilles de plus de 4 000 ans ont permis de mettre en évidence que déjà à cette période, l'humanité souffrait déjà de cette affection. Ainsi, les différents travaux révèlent que les facteurs environnementaux/ favorisant/prédisposant étaient différents qu'à l'heure actuelle, mais il n'en résulte cependant pas moins que les lésions étaient belles et bien présentes (**figure 20**) **(Thompson et al. 2013)**.

[12] Momies égyptiennes, péruviennes, d'Alaska, plaines du Colorado… ayant donc vécues à différents endroits du globe et à différentes époques

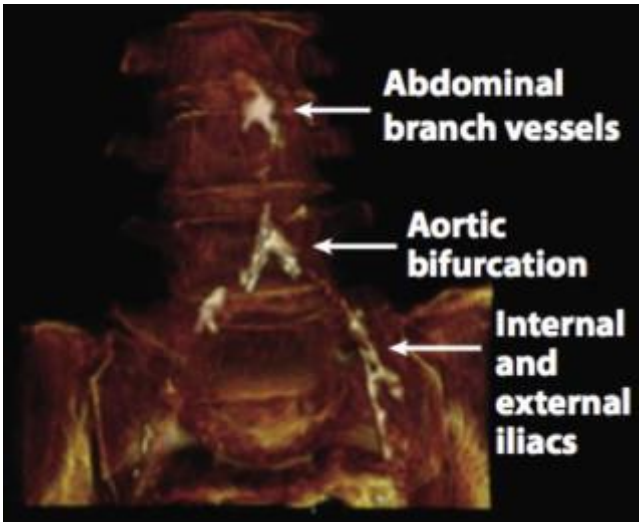


Figure 20 Observations de calcifications aortiques observes au scanner sur une momie de l'Egypte ancienne

(Thompson et al. 2013)

Les premières descriptions anatomo-pathologiques remontent à la première moitié du 18ème siècle où le médecin allemand Krell décrit des lésions calciques au niveau de la paroi artérielle, différentes des calcifications osseuses (en 1746). Plus tard, Vogel isole des éléments de cholestérol au niveau de ces lésions (1843). En 1904, Marchand décrit des dépôts « jaunâtres » au niveau de l'intima/média, et pour la première fois emploie le mot « athérosclérose » (du grec « athéré » : bouillie, et « skléros » : dur).

B. Définition et classification des lésions

L'OMS donne en 1958 une définition de l'athérosclérose comme étant « *une association variable de remaniements de l'intima des grosses et moyennes artères, consistant en une accumulation segmentaire de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout accompagné de modifications de la média* ».

L'athérosclérose se définit comme une pathologie chronique inflammatoire touchant les artères de gros et moyens calibres[13]. Elle se caractérise par la formation d'une plaque lipidique au niveau de la paroi artérielle. Ce dépôt constitue l'athérome. La formation des plaques s'échelonnent sur de nombreuses années, en débutant dès l'enfance. A terme, les plaques d'athérome peuvent entraîner une sclérose artérielle, à une obstruction des vaisseaux, ou encore, en cas de rupture, avoir des conséquences plus dramatiques sur le devenir du sujet **(Ross 1999)**. Ainsi, les pathologies cardiovasculaires, avec les complications de l'athérosclérose sont responsables des 2 premières causes de mortalité dans le monde (infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral) (**figure 21**).

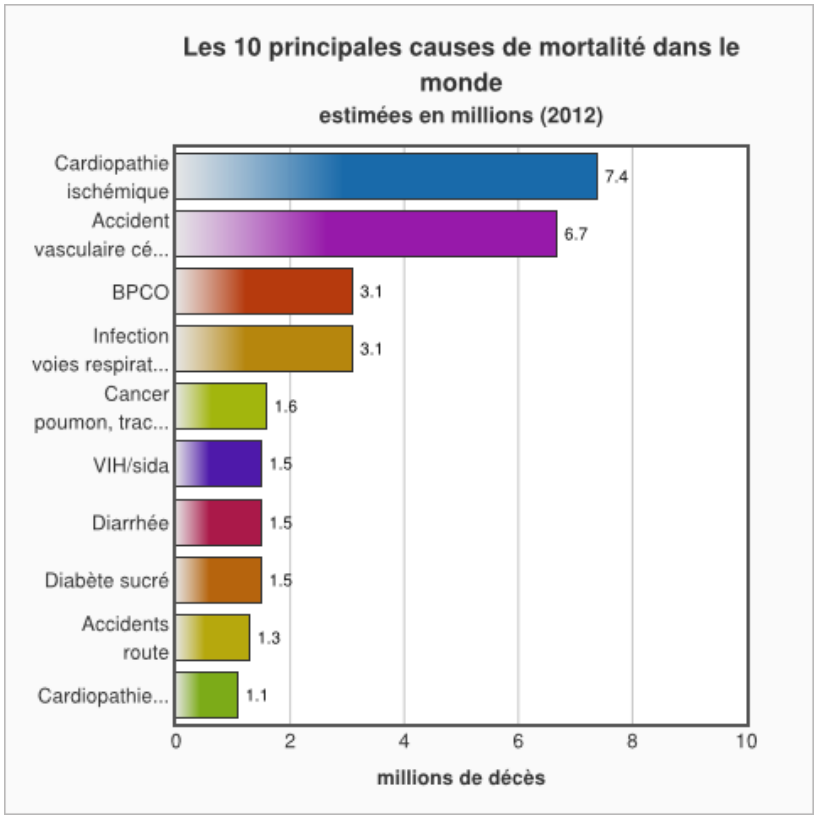


Figure 21 Les 10 principales causes de mortalité dans le monde en 2012 *(OMS, 2012)*

[13] Typiquement, l'athérosclérose atteint les artères coronaires, les artères crâniennes et extra-crâniennes, la crosse aortique, les artères fémorales, et dans une moindre mesure, les artères rénales, zones dans lesquelles les forces de cisaillement sont faibles.

D’après les estimations de l’OMS, d’ici 2030, près de 23,6 millions de personnes décèderont de maladies cardiovasculaires, principalement de cardiopathies et d’accidents vasculaires cérébraux.

L’American Heart Association a établi depuis 1994 une classification anatomopathologique des différents stades lésionnels, qui est toujours d’actualité **(Stary et al. 1994)**.

On considère ainsi 6 stades évolutifs de la pathologie athéromateuse, dont l’évolution reste difficilement prévisible. Les lésions précoces (type I à III) sont des lésions cliniquement silencieuses (**Table 11**).

La physiopathologie de l’athérosclérose sera abordée plus en détails dans le second point de cette partie introductive.

Nomenclature and main histology	Sequences in progression	Main growth mechanism	Earliest onset	Clinical corre-lation
Type I (initial) lesion isolated macrophage foam cells	I	growth mainly by lipid accumu-lation	from first decade	clinically silent
Type II (fatty streak) lesion mainly intracellular lipid accumulation	II			
Type III (intermediate) lesion Type II changes & small extracellular lipid pools	III		from third decade	
Type IV (atheroma) lesion Type II changes & core of extracellular lipid	IV			clinically silent or overt
Type V (fibroatheroma) lesion lipid core & fibrotic layer, or multiple lipid cores & fibrotic layers, or mainly calcific, or mainly fibrotic	V	accelerated smooth muscle and collagen increase	from fourth decade	
Type VI (complicated) lesion surface defect, hematoma-hemorrhage, thrombus	VI	thrombosis, hematoma		

Table 11 Classification anatomo-pathologique des lésions de l'AHA

Stade I (le plus précoce, il est seulement microscopique): Des macrophages spumeux isolés apparaissent dans la couche sous-endothéliale de l'intima ; Stade II (la première lésion vue à l'examen macroscopique) : des macrophages spumeux se groupent en petits amas de la couche sous-endothéliale de l'intima où ils forment les stries lipidiques. Ces lésions allongées jaunâtres planes, parallèles au flux sanguin, sont vues à l'ouverture de l'artère. Elles siègent préférentiellement sur l'aorte thoracique ; Stade III : Des lipides extra-cellulaires s'accumulent en faible quantité à côté des macrophages spumeux ; Stade IV : les lipides extracellulaires sont plus abondants. Ils comportent des fentes de cristaux de cholestérol, sans réaction fibreuse. Stade V : la plaque d'athérosclérose, ou d'athérome (plaque fibrolipidique) non compliquée. De taille variable, jaunâtre, elle fait saillie dans la lumière artérielle. Elle est souvent calcifiée. Sa section montre un centre lipidique, constitué de cellules spumeuses et de fentes de cristaux de cholestérol, entouré d'une gaine fibreuse. Celle-ci est constituée de fibres de collagène enserrant des cellules musculaires lisses. Des lymphocytes T sont aussi observés. L'endothélium recouvrant la plaque est intact ; Stade VI : la plaque d'athérosclérose compliquée avec :

- ulcération, caractérisée par la rupture de l'endothélium
- hémorragie dans la plaque
- thrombose.

C. Structure de la paroi artérielle

Une artère « normale », saine, est constituée de 3 tuniques concentriques, possédant chacune leur propre morphologie, avec de l'intérieur (côté de la lumière du vaisseau) vers l'extérieur l'intima, la média et l'adventice. La **figure 22** permet d'illustrer la structure classique d'une artère.

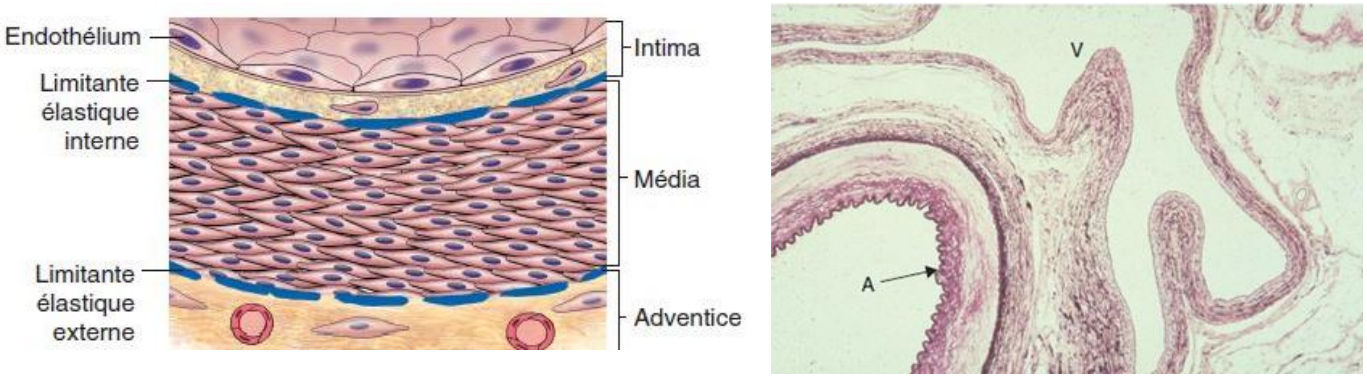


Figure 22 Illustration d'une coupe transversale d'une artère musculaire (à gauche) ; Préparation histologique montrant une artère (A) et une veine (V) (à droite)

(Source : Université Médicale Virtuelle Francophone)

- **L'intima** : c'est la couche interne de la paroi artérielle. Elle se compose principalement d'une monocouche de cellules endothéliales, formant l'endothélium, directement en contact avec la circulation sanguine. Couche d'une épaisseur d'environ 15 µm, l'endothélium constitue une barrière entre le sang et les tissus.

  Les cellules endothéliales reposent sur une membrane basale, séparée de la lame élastique interne par une zone virtuelle acellulaire, la zone sous-endothéliale. La limitante élastique interne d'épaisseur d'environ 40-80 µm est composée de fibres élastiques (élastine) qui sépare l'intima de la média.

  En plus de sa fonction de barrière sélective, l'endothélium intervient dans la régulation d'autres processus physiologiques : régulation de l'hémostase, médiation de l'inflammation et de l'immunité, maintien du tonus vasculaire, croissance vasculaire et l'angiogénèse. C'est au niveau de l'intima que se développent les lésions athéromateuses.

- **La média** : ou tunique moyenne de l'artère, c'est la couche principale de l'artère. Elle est principalement composée de cellules musculaires lisses et est limitée par les lamitantes élastiques interne et externe. Celles-ci sont percées de fenestrations permettant le passage bidirectionnel de substances et de cellules. La media se compose de l'empilement concentrique d'unités lamellaires formées de cellules musculaires lisses (CML) et d'une matrice conjonctive (contenant de l'élastine, du collagène, des mucopolysaccharides). La composition matricielle permet de faire le distingo entre 2 grands types d'artères :

    - Les artères musculaires : artères coronaires, fémorales, tibiales, brachiales, rénales et artérioles : comportant peu ou pas de fibres élastiques, les fonctions vasomotrices de ces vaisseaux sont assurées par les CML ;

    - Les artères élastiques : aorte, troncs artériels supra-aortiques, carotides, artères iliaques : possèdent une média riche en fibres élastiques assurant la compliance artérielle.

- **L'adventice** : tunique la plus externe de l'artère, elle est composée de tissu conjonctif. Elle repose sur une limitante élastique externe, contient des fibroblastes, des cellules adipeuses et les vasa-vasorum, assurant le rôle nourricier du vaisseau dans la partie externe de la média (qui est avasculaire lorsque son épaisseur n'atteint pas une trentaine d'unités lamellaires).

Le maintien de l'intégrité de ces différentes structures est donc primordial pour assurer l'homéostasie vasculaire.

D. Facteurs de risques

Un facteur de risque est défini comme étant une condition associée à une augmentation de l'incidence de la maladie, avec un lien supposé causal, contrairement à un marqueur de risque, qui est une condition associée à la maladie mais sans nécessairement cette relation de causalité.

Les facteurs de risques sont déterminés à partir de l'observation de population et les études épidémiologiques qui en découlent permettent de mettre en évidence des facteurs de risque dits «non-modifiables » ou d'autres facteurs dits «modifiables ». Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés et validés pour leur association à l'athérosclérose (repris dans la **Table 12**).

Facteurs de risque « non-modifiables »	Facteurs de risque « modifiables »
• Âge • Sexe • Antécédents familiaux	• Dyslipidémies: hypercholestérolémie • Tabagisme • Hypertension artérielle • Diabète • Obésité • Autres (nouveaux) facteurs

Table 12 Facteurs de risque de l'athérosclérose « non-modifiables » et « modifiables » - Concernant les «nouveaux » facteurs de risques modifiables, on retrouve le taux d'homocystéinéine, des molécules de l'inflammation telles que la CRP, et des molécules de la coagulation.

L’étude canadienne de 2004 -INTERHEART- **(Yusuf et al. 2004)** rapporte que près de 90% des accidents vasculaires sont attribuables à 9 facteurs de risque modifiables à savoir : le tabagisme, le diabète, l’hypertension, obésité, stress psycho-social, alimentation, sédentarité, consommation d’alcool et le ratio ApoB/ApoA1 (qui permet d’estimer la balance les lipoprotéines pro/anti-athérogéniques **(Walldius et al. 2005)**.

2. Physiopathologie de l'athérosclérose

A. Histoire de la formation de la plaque d'athérome

i. Infiltration et accumulation des lipoprotéines au sein de l'intima

La première étape de la pathologie se caractérise par une accumulation des lipoprotéines de faible densité (LDL, LDL-cholestérol) au niveau intimal, préférentiellement au niveau des bifurcations et des courbures artérielles où les contraintes de cisaillement faibles sont susceptibles d'induire une activation endothéliale (stade I de la classification des lésions de l'AHA) **(Caro 2009)**. Ces lipides une fois infiltrés dans l'intima, vont subir des modifications oxydatives par les macrophages présents dans la paroi vasculaire.

ii. Recrutement des monocytes circulants et différenciation en macrophages

En situation normale, l'endothélium n'exprime pas de molécules d'adhésion permettant le recrutement des cellules de l'immunité circulantes. Or, au cours du développement de l'athérosclérose, l'endothélium subit une activation ou une dysfonction endothéliale (DE), notamment due à la présence de LDL-oxydés dans l'intima. La dysfonction endothéliale désigne un ensemble de modifications phénotypiques de l'endothélium qui engendre des perturbations dans la réponse vasomotrice, les propriétés anti-thrombotiques, et une augmentation de la perméabilité vasculaire. C'est un processus majeur dans la physiopathologie de nombreuses pathologies vasculaires. La **Table 13** présente succinctement les biomarqueurs « classiquement » identifiés comme témoins de ce phénomène.

Marqueur	Variation	Références
vWF	↗	(Horvath et al. 2004)
Thrombomoduline	↗	(Boffa et al. 1991)
TWEAKs	↗	(Yilmaz et al. 2011)
Visfatine soluble	↗	(Malyszko et al. 2010)
PAI-1	↗	(Binder et al. 2002)
E-Selectine	↗	(Bevilacqua et al. 1987; Constans et al. 2006)
ICAM-1	↗	(Hahne et al. 1994; Wu 2007)
VCAM-1	↗	
Syndecan I	↗	
Heparan sulfate	↗	(Rabelink et al. 2010)
CD146 soluble	↗	
ET-1	↗	(Yanagisawa et al. 1988; Giaid et al. 1993; Kawanabe et al. 2011)
ADMA	↗	(Schwedhelm et al. 2011)
Métabolites du NO	↘	
Cellules endothéliales circulantes	↗	(Constans and Conri 2006; Rabelink, de Boer et al. 2010)
Microparticules endothéliales	↗	
Cellules progénitrices endothéliales	↗	

Table 13 Biomarqueurs de la dysfonction endothéliale

Ainsi, les cellules endothéliales « activées » expriment à leur surface des molécules, permettant l'adhésion des cellules de l'immunité: les CAM – Cellular Adhesion Molecules, telles que E-Sel, VCAM-1 et ICAM-1. L'expression surfacique de ces CAM permet la liaison des intégrines présents à la membrane des leucocytes circulants (Demerath et al. 2001; Constans and Conri 2006).

En cas d'adhésion, le monocyte pénètre l'espace sous-endothélial (diapédèse). Il se différencie alors en macrophage. Les macrophages vont alors phagocyter les LDL-oxydés et se transformer en cellules spumeuses, par l'intermédiaire notamment de récepteurs dits « scavengers », tels que CD36, CD68 **(Bobryshev 2006)**.

Ces macrophages jouent un rôle capital dans la progression de la pathologie. En effet, ils sont en mesure de produire une variété de molécules pro-inflammatoires qui augmentent la réaction inflammatoire, l'auto-amplification, l'activation endothéliale…

iii. Formation du cœur lipidique et de la chape fibreuse

Les cellules spumeuses vont s'accumuler dans l'espace sous endothélial et constituer ainsi les premières lésions dites « stries lipidiques » (et correspond au stade II de la classification de l'AHA).

Les LDL-oxydés présents dans l'espace vasculaire stimulent diverses voies de signalisation, notamment pro-inflammatoires, qui participent à l'activation endothéliale, ainsi qu'à la prolifération et à la migration des cellules musculaires lisses (CML), à partir de la média, vers l'intima. Les CML sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire, ce qui permet la formation d'une chape fibreuse **(Albiero et al. 2010)**.

La lésion évolue vers la formation d'un cœur lipidique, formé de l'accumulation de lipides au sein d'un noyau nécrotique au centre de la lésion, lui-même entouré d'une chape fibreuse qui se compose donc de cellules musculaires lisses provenant de la média, et de protéines de matrice extracellulaire : collagène, élastine, protéoglycane (lésion de type III, ou préathéromateuses).

La **figure 23** illustre ces premières étapes de formation de la plaque d'athérome.

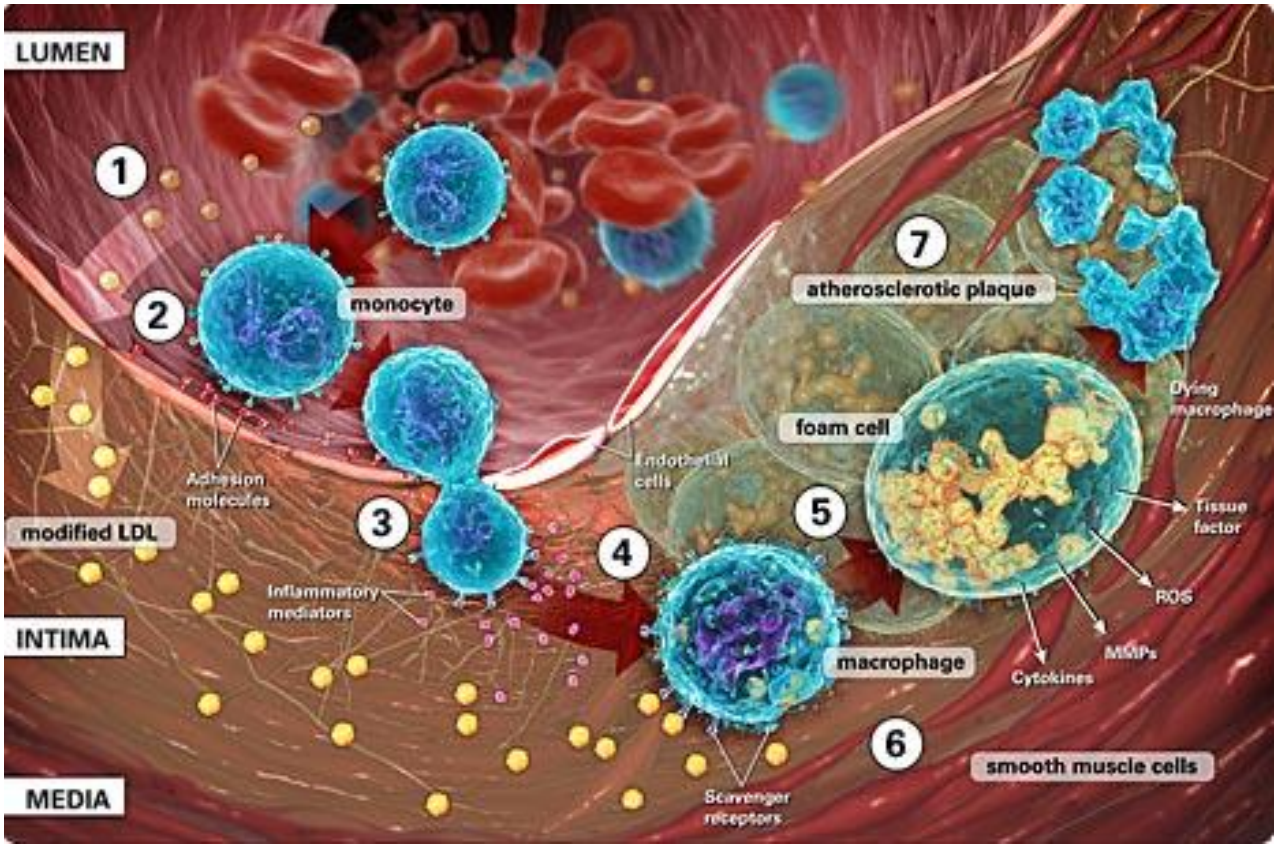


Figure 23 Etapes d'initiation de la formation de la plaque d'athérome

Les LDL en excès dans la circulation sanguine subissent des modifications oxydatives dans l'espace sous endothélial (1). Les monocytes adhèrent à l'endothélium par le biais de l'expression des CAM induites par des médiateurs inflammatoires (2-3), et se différencient en macrophages (4). Ces derniers internalisent les LDL-ox et se transforment en cellules spumeuses (5), à l'origine des premières stries lipidiques.

(Source : http://medlab.cs.uoi.gr/atherosclerosis.asp)

B. Evolution – progression de la plaque d'athérome

L'évolution de la plaque d'athérome se fait sur des années. La progression de la plaque entraîne une sténose, une diminution de la lumière artérielle. Cette sténose peut être compensée par un remodelage vasculaire : on observe une dilatation du vaisseau pour compenser la protrusion de la plaque dans la lumière **(Glagov et al. 1987)**.

Une plaque peut évoluer vers un phénotype de plaque « vulnérable » ou « stable ». Une plaque vulnérable se caractérise par une chape fibreuse fine, un centre lipidique important, un infiltrat inflammatoire, et peu de cellules musculaires lisses, alors qu'une plaque

« stabilisée » se caractérise quant à elle par une épaisse chape fibreuse, un core lipidique réduit, peu de cellules inflammatoires et une matrice extracellulaire dense **(Virmani et al. 2002)** (**figure 24**).

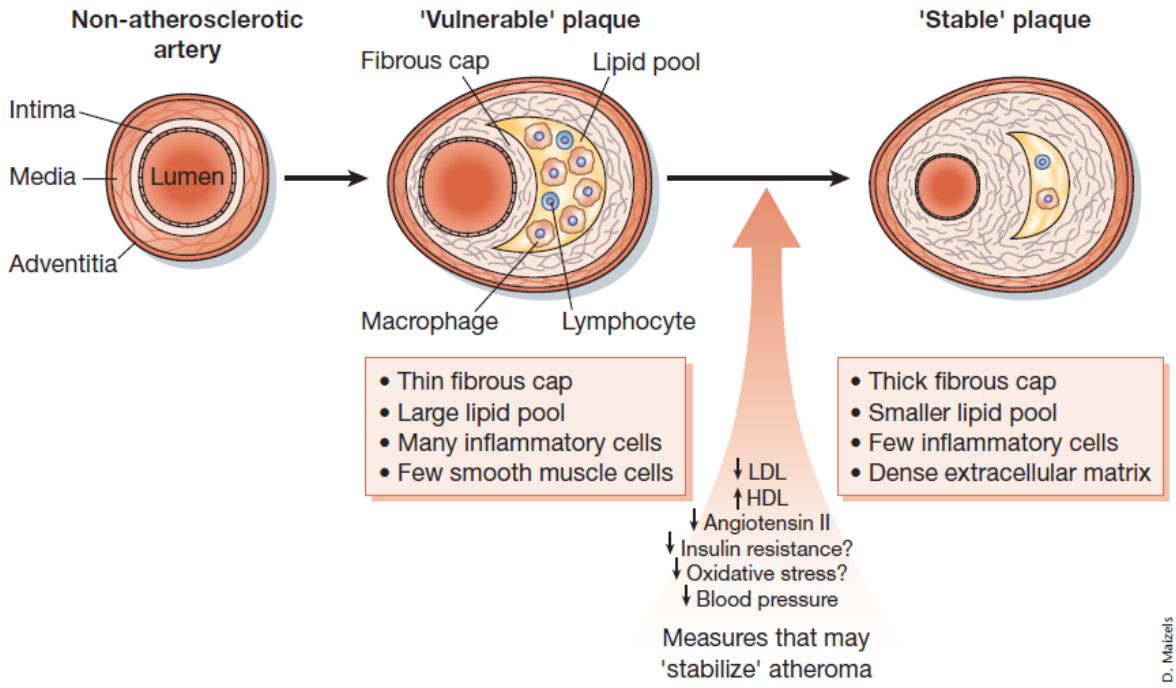


Figure 24 Plaque « vulnérable » et plaque « stable » *(Libby 2002)*

L'intégrité de la chape fibreuse est un élément primordial quant à la stabilité des plaques d'athérome, et conditionne son évolution.

Le remodelage vasculaire qui s'opère est un processus complexe faisant intervenir de nombreux types cellulaires. Parmi les acteurs de ce remodelage, le rôle des métalloprotéinases (MMPs) est primordial dans le maintien de l'intégrité de la chape fibreuse **(Galis et al. 2002; Newby 2006)**.

Mises en évidence en 1962 par des chercheurs qui étudiaient alors la métamorphose du têtard **(Gross et al. 1962)**, les MMPs sont des endopeptidases ayant la capacité de dégrader la matrice extra-cellulaire et de pouvoir ainsi faciliter notamment la progression et la migration cellulaire **(Visse et al. 2003)**.

A l'heure actuelle, plus de 20 membres de la famille des MMPs ont été identifiés et regroupés en fonction de leur structure et de leurs substrats respectifs. D'une façon générale, ces enzymes sont composées d'un pro-domaine, d'un domaine catalytique, d'une région charnière, et d'un domaine hémopexine (**Table 14**).

La plupart des MMPs sont sécrétées sous forme de précurseurs (zymogènes), qui sont activés dans l'espace extracellulaire. L'activité des MMP dans l'espace extracellulaire est inhibée (entre autres) par des inhibiteurs endogènes, les TIMPs[14], produits par les cellules musculaires lisses et les macrophages **(Galis et al. 1994; Carrell et al. 2002)**.

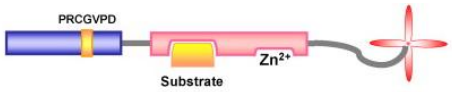
Classe	**Numérotation**	**Structure** Prodomain Catalytic domain Hinge Hemopexin
Collagénases	MMP-1 = collagénase interstitielle MMP-8 = collagénase neutrophile MMP-13 = collagénase 3	
Gélatinases	MMP-2 = gélatinase A MMP-9 = gélatinase B	
Stromélysines	MMP-3 = stromélysine 1 MMP-10 = stromélysine 2 MMP-11 = stromélysine 3	
Matrilysines	MMP-7 = matrilysine 1 MMP-26 = matrilysine 2	
Membrane-type MMP	MMP-14 = MT1-MMP MMP-15 = MT2-MMP MMP-16 = MT3-MMP MMP-17 = MT4-MMP MMP-24 = MT5-MMP MMP-25 = MT6-MMP	
Autres	MMP-12 = métalloélastase MMP-18, MMP-19, MMP-20 = énamélysine MMP-21, MMP-22, MMP-23A/B, MMP-27, MMP-28	

Table 14 Classification et nomination des MMPs

[14] TIMP= tissue inhibitors of MMP. 4 membres de cette famille ont été identifiés chez les Vertébrés.

L’amincissement de la chape fibreuse entourant la plaque pouvant aller jusqu’à la rupture à des conséquences dramatiques pour le sujet. Les éléments contenus dans la plaque sont mis en contact avec les éléments de la circulation sanguine (agrégation plaquettaire), entraînant la formation d’un thrombus pouvant obstruer partiellement ou totalement le vaisseau (**figure 25**).

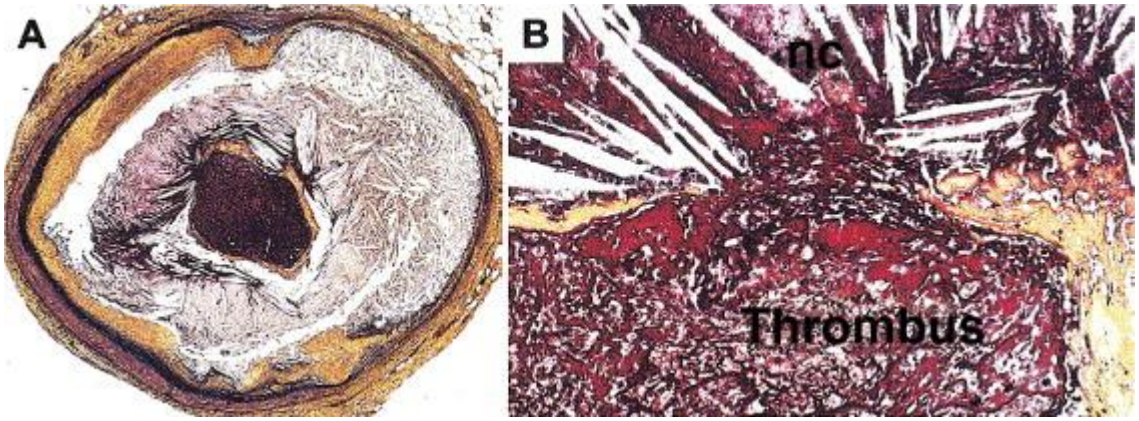


Figure 25 Coupe histologique d'une artère présentant une rupture de la plaque d'athérome (coloration Movat Pentachrome). On remarquera la présence d’un large core nécrotique avec de nombreux cristaux de cholestérol (A, grossissement x 20). Grossissement de la zone de rupture montrant (B, grossissement x 400) *(Virmani et al. 2006)*

3. Stress oxydant et athérosclérose

Le stress oxydant est une composante majeure de la physiopathologie de l'athérosclérose, et notamment l'oxydation des LDL, qui présentent un fort pouvoir athérogène. L'augmentation de leur production induit une activation endothéliale, une réponse inflammatoire, et la prolifération des CML, à l'origine des lésions athéromateuses.

A. Généralités sur le stress oxydant

i. Définition

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives (ER) produites en permanence au niveau des différentes composantes cellulaires vasculaires, et leur neutralisation par les systèmes de défense anti-oxydants **(Riley 1994)**.

Une régulation de cet équilibre « rédox » se produit en permanence, et lorsqu'il bascule vers une augmentation de la concentration des ER, sans une réponse anti-oxydante pour la neutraliser, l'homéostasie rédox n'est plus assurée, un stress oxydant s'installe.

ii. Les espèces réactives

Les espèces réactivent proviennent de sources endogènes[15] ou de sources exogènes[16], et se composent de 2 familles : les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN). Les ERO et les ERN peuvent être de deux natures : radicalaires[17] ou non-

[15] Sources endogènes : chaîne respiratoire mitochondriale, cellules (PNN, macrophages…), enzymes (NADPHoxydase…)

[16] Sources exogènes : irradiations, polluants, médicaments…

[17] Espèce radicalaire : possédant un ou plusieurs électrons libres sur sa couche périphérique, lui conférant une grande réactivité

radicalaires. Parmi les ER les plus importantes on retrouve l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle ($^{\cdot}HO$), le monoxyde d'azote (NO), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$).

Les espèces réactives de l'oxygène sont majoritairement produites par la NADPH oxydase membranaire. Le substrat de base de ce système enzymatique est le $O_2^{\cdot -}$ qui est rapidement transformé en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 est ensuite converti à son tour par deux enzymes que sont la catalase (CAT) et la gluthation peroxydase (GPx).

De façon schématique, la NADPH oxydase (NOX) se compose de 4 sous-unités majeures, nécessaires à l'activation du complexe : le cytochrome b558 (membranaire) formé de la $gp91^{phox}$ et de la $p22^{phox}$ (ou autres NOX), et de sous unités régulatrices que sont $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, and $p40^{phox}$. Il existe également une petite protéine G cytosolique (rac) qui participe à l'assemblage du complexe actif.

La NADPH oxydase catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène (O_2), ce qui produit du $NADP^+$, du H^+ et de l'O_2^-. Ces deux derniers réagiront pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 réagira avec un proton H^+ et un anion chlorure Cl^- pour donner de l'acide hypochloreux (HOCl) ainsi qu'une molécule d'eau (**figure 26**).

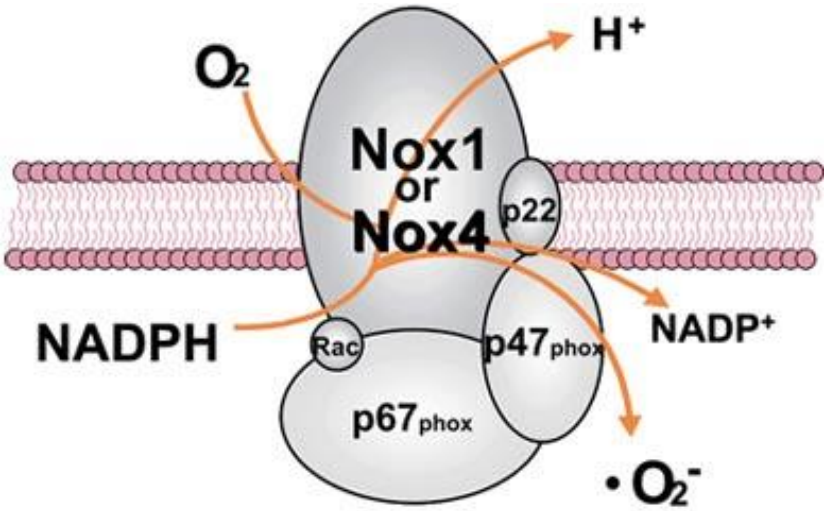


Figure 26 Structure de la NADPH oxydase *(Dusting et al. 2005)*

L'activité enzymatique des NADPH oxydases du système cardiovasculaire constitue la principale source d'ER au niveau des cellules vasculaires et cardiaques. Il est à présent reconnu que la NADPH oxydase joue un rôle majeur dans la production d'anions superoxydes par les cellules vasculaires, et qu'une activation anormale est associée à la DE, à l'hypertrophie vasculaire et à un risque augmenté d'athérosclérose **(Griendling et al. 2000; Sorescu et al. 2001)**.

Le monoxyde d'azote est produit au niveau cellulaire à partir d'arginine et d'oxygène. Cette réaction est opérée par la famille des NO synthases (NOS). On distingue 3 types de NOS : NOS neuronale et NOS endothéliale, dont l'expression est constitutive ; et la NOS inductible dont l'activité est régulée par la concentration intracellulaire de calcium. Le $^{\cdot}NO$ peut être converti en ion nitrosium (NO^{+}), en anion nitroxyl (NO^{-}) ou en peroxynitrite ($ONOO^{-}$).

Possédant une grande réactivité, les ER ont la capacité de s'attaquer à de nombreuses cibles biologiques, dont les lipides, les protéines et les acides nucléiques. La finalité de ces attaques est d'entraîner des dommages cellulaires, venant perturber l'intégrité du système.

iii. Les anti-oxydants

Un anti-oxydant se défini comme étant une substance capable, à très faible concentration, de prévenir ou de retarder l'oxydation d'un substrat. Le rôle de ces entités est d'empêcher la formation de radicaux libres et de permettre leur élimination, et également de réparer les dommages causés par ces derniers **(Foulon et al. 1999)**.

Il existe plusieurs sortes d'anti-oxydants : enzymes, facteurs de transcription, composés de bas poids moléculaires captant les radicaux libres (tels que le glutathion, les vitamines A, C, E, les polyphénols…).

La **figure 27** permet de mettre en évidence les différents acteurs du système redox :

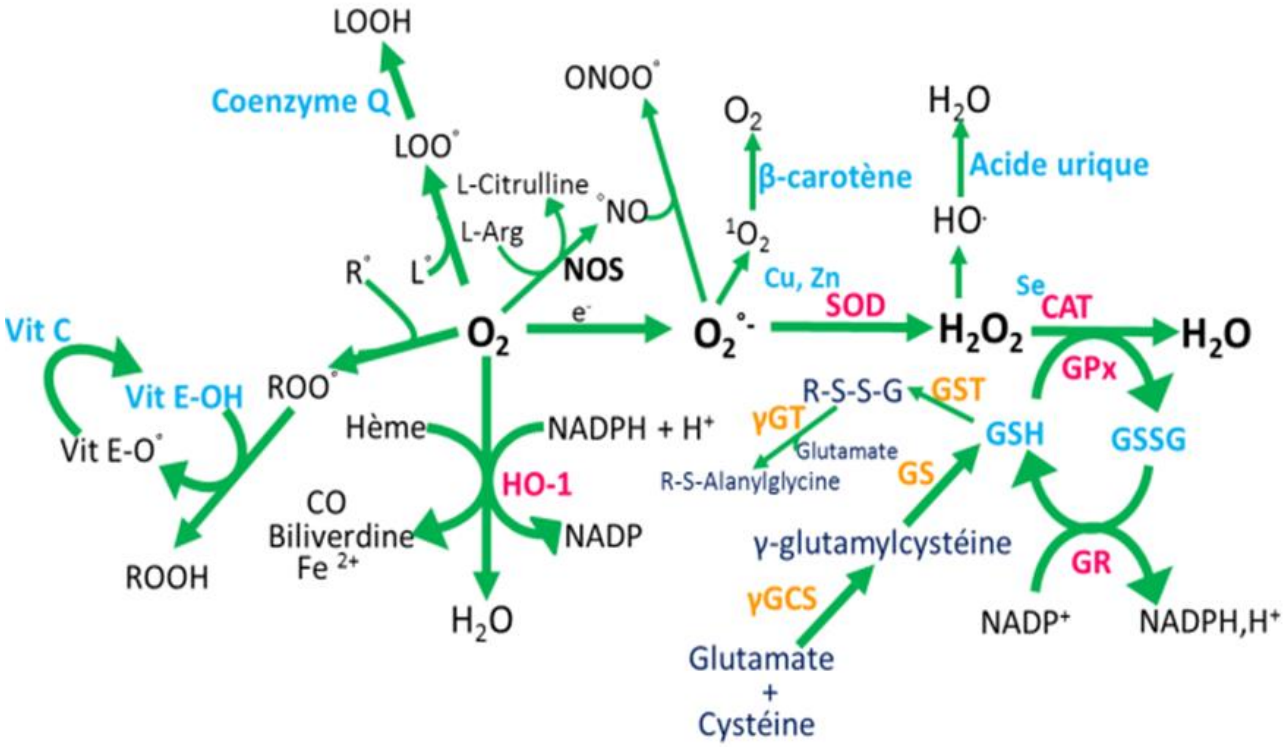


Figure 27 Les acteurs du système redox

En rose : **enzymes anti-oxydantes**, en orange : **enzymes impliquées dans la synthèse du glutathion**, en bleu : **anti-oxydants naturels et glutathion**

CO : monoxyde de carbone ; Cu, ZN SOD : Cuivre, Zinc SOD ; Fe2+ : ions ferreux, GS : Glutathion synthétase ; GST : Glutathion-S-Transférase ; GR : Glutathion Réductase ; γ-GCS : Gamma-Glutamyl-Cystéine Synthétase ; GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; HO-1 : Hème Oxygénase 1 ; L-Arg : L-Arginine ; $^1O_2$: Oxygène singulet ; Se : Sélénium

Extrait de la thèse de Clémentine Poisson : Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique (2013)

B. Stress oxydant et athérosclérose

Dans le système cardiovasculaire, les ER tiennent une part importante en maintenant l'intégrité cardiaque et vasculaire, et également un rôle pathologique dans la dysfonction endothéliale et l'inflammation, associées notamment à l'athérosclérose **(Harrison et al. 2003)**.

Il existe un équilibre physiologique qui permet le maintien de la balance entre la production et l'élimination des ER. Sous l'effet de divers stimuli, endogènes (hypertension, diabète…) ou exogènes (tabagisme, polluants environnementaux…), cet équilibre peut être perturbé, entraînant un stress oxydant délétère pour les composants cellulaires de la paroi artérielle, engendrant des dysfonctionnements (**figure 28**). Ce stress peut être limité grâce à l'action du système de défense antioxydant. Lorsque celui-ci perdure, un nouvel équilibre de niveau plus élevé peut être atteint et avoir des conséquences en pathologie.

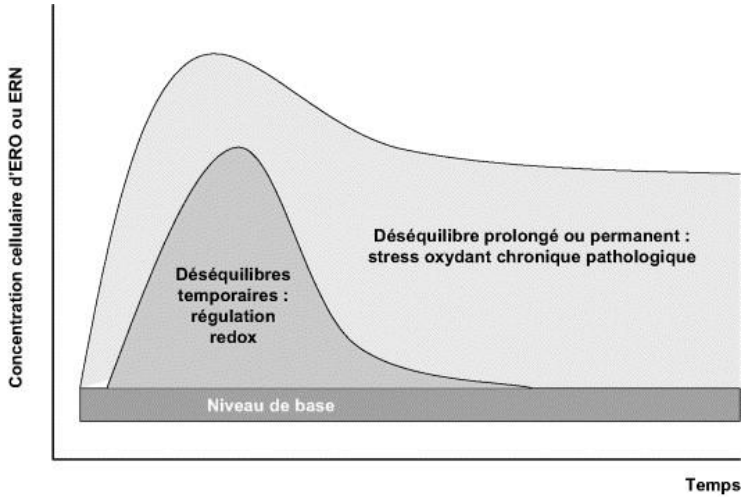


Figure 28 Modification de l'équilibre redox cellulaire lors de la production aigue et chronique d'ER *(d'après Beaudeux J.-L. et al, 2006)*

Le stress oxydant active des voies de signalisation et des facteurs de transcription tels que NF-κB, modifiant les voies de croissance, de prolifération et d'apoptose cellulaire. Ces gènes

sont également impliqués dans les processus inflammatoires, liant ainsi le stress oxydant vasculaire et la réaction inflammatoire chronique caractérisant l'athérosclérose.

Selon la théorie oxydative de l'athérosclérose, l'oxydation des LDLs est une des conséquences de la génération de ROS au sein de la paroi vasculaire, et cette modification serait le point d'initiation du processus athérogène, en favorisant le recrutement et l'infiltration des monocytes au niveau intimal, entraînant la formation des stries lipidiques.

4. Exposition aux rayonnements ionisants et CVD

A. Traitement par radiothérapie et risque cardiovasculaire

i. Traitement par radiothérapie de pathologies cancéreuses

A l'heure actuelle, la radiothérapie constitue l'outil thérapeutique majeur de l'oncologue. En effet, en 2010, près de 60% des patients diagnostiqués vont bénéficier de ce traitement. Il en résulte nécessairement des dommages pour les tissus sains péri-tumoraux situés dans le champ d'irradiation, ayant d'éventuelles complications radio-induites à long terme.

Depuis les années 70, diverses études cliniques et expérimentales ont permis de mettre en évidence que le système cardiovasculaire est l'un des systèmes qui peut être affecté lors de cette technique.

Le risque cardiovasculaire pour une exposition à forte dose d'irradiation est à présent bien établi **(McGale et al. 2005)**. Ce risque a été mis en évidence chez des patients traités par radiothérapie thoracique pour un lymphome de Hodgkin **(Adams et al. 2004)** et dans la radiothérapie de patientes atteintes de cancer du sein ayant reçu une dose supérieur à 5 Gy **(Darby et al. 2011)**. Chez ces femmes traitées par radiothérapie, les études montrent que le risque de décès de cause cardiovasculaire est augmenté de 30 %, et même plus de 10 ans après le traitement **(Hooning et al. 2007)**.

La **table 15** présente le risque relatif[18] de cancers radio-induits en France en 2006 suite à un traitement par radiothérapie.

[18] Le risque relatif mesure le risque de survenue d'un événement dans un groupe par rapport à un autre. Ici, il s'agit du rapport de l'incidence de l'évènement cardiovasculaire chez les patients après radiothérapie sur l'incidence de cet événement dans la population témoin.

Cancer	Incidence du cancer	Evénement Cardiovasculaire	Risque Relatif (IC 95%)
Sein	50 000	Infarctus du myocarde	1,33 (1,14 - 1,55)
Tête et cou	20 000	AVC	5,6 (3,1 - 9,4)
Testicule	2 000	Infarctus du myocarde	2,33 (1,01 - 4,59)
Lymphome de Hodgkin	1 300	Infarctus du myocarde	2,9 (2,4 - 3,5)
		AVC	
		AIT	

Table 15 Risque relatif des événements cardiovasculaires après radiothérapie selon les cancers en France en 2006. IC = intervalle de confiance ; AVC = accident vasculaire cérébral, AIT = accident ischémique transitoire

(*Source: Revue Médecine/Sciences 2010, 26 : 740-6)*

ii. Traitement par radiothérapie de pathologies non-cancéreuses

Des patients traités par radiothérapie pour des ulcères gastriques (radiothérapie fractionnée, dose totale de 9-18 Sv), chez lesquels la dose reçue au cœur de l'ordre de quelques Gy présentent un risque de mortalité cardiovasculaire significativement augmenté de près de 20 % **(Carr et al. 2005)**.

De plus, les données expérimentales montrent qu'une exposition à fortes doses de rayonnement (reçue en « aigue » ou de façon fractionnée), généralement en accord avec les données humaines, accélère le développement de l'athérosclérose, en favorisant la formation de plaques inflammatoires/thrombotiques, particulièrement dans les modèles animaux prédisposés. **Cottin et al** ont notamment montré qu'une irradiation localisée d'artère de lapins en hypercholestérolémie induisait une accélération de la formation des lésions athéromateuses prédisposés **(Cottin et al. 2001)**.

Chez des souris prédisposées ApoE$^{-/-}$, après une irradiation unique de 14 Gy au niveau des artères carotides, il y a également une accélération de la progression des lésions **(Stewart et**

al. 2006; Hoving et al. 2008). Ces animaux présentent des plaques d'athérome en plus grand nombre, composé d'un noyau lipidique plus important, comparativement aux souris non-irradiées. De plus, l'analyse des plaques d'athérome souligne une implication des macrophages et des granulocytes, ainsi qu'une quantité de collagène intra-plaque diminuée, suggérant des conséquences quant à leur stabilité. La détection de cellules érythrocytaires phagocytées par des macrophages au sein des plaques des carotides irradiées suggère également la mise en place d'un processus hémorragique. Les plaques développées chez les animaux irradiés présentent également des dépôts de fibrine plus importants que chez les animaux témoins suggérant ainsi l'induction de processus thrombotiques (**figure 29**).

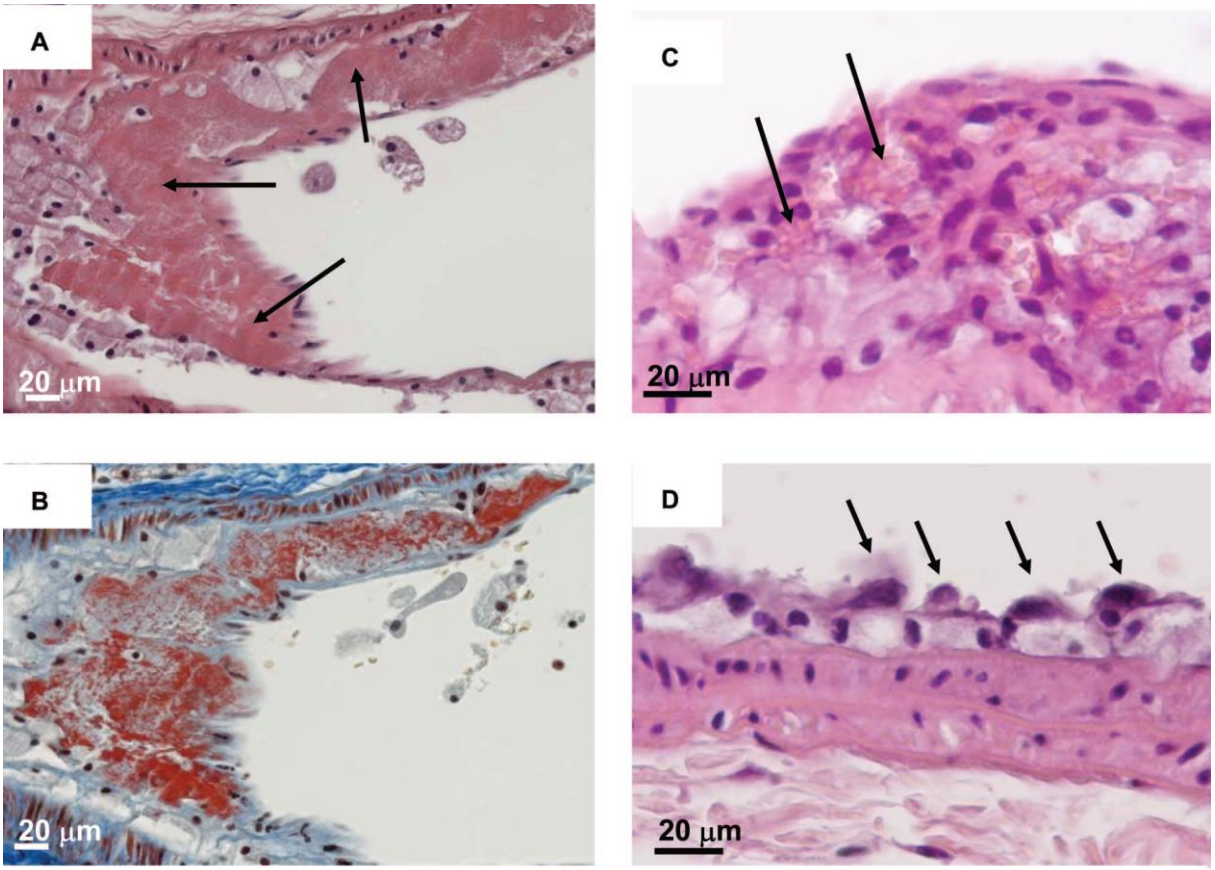


Figure 29 Etudes des lésions radio-induites au niveau de l'artère carotide.
A : coloration H&E révélant les dépôts de fibrine au niveau d'une lésion, chez un animal irradié (flèches noires), confirmé par la coloration Martius-Scarlet-blue, où les dépôts de fibrine apparaissent en rouge (B). C et D: coloration H&E révélant la présence de macrophages contenant des erythrocytes (C) et la présence de cellules endothéliales atypiques (D). *(Stewart et al. 2006)*

Les lésions d'athérosclérose qui se développent semblent adopter un profil spécifique, conséquence de l'irradiation subie. Aussi, ces modèles expérimentaux semblent être tout à fait pertinents dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires radio-induits au niveau des artères.

iii. Mécanismes physiopathologiques radio-induits à fortes doses

Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à une exposition à des rayonnements ionisants sont encore mal connus. Des études épidémiologiques réalisées chez des patients traités par radiothérapie (cancer du sein, lymphome de Hodgkin notamment) ont montré qu'il existe un lien entre l'exposition aux rayonnements ionisants et le risque de développer à plus ou moins long terme des affections cardiovasculaires.

Ainsi, les pathologies cardiovasculaires radio-induites résulteraient de l'atteinte du cœur et des gros vaisseaux, comme le résume la **figure 30**.

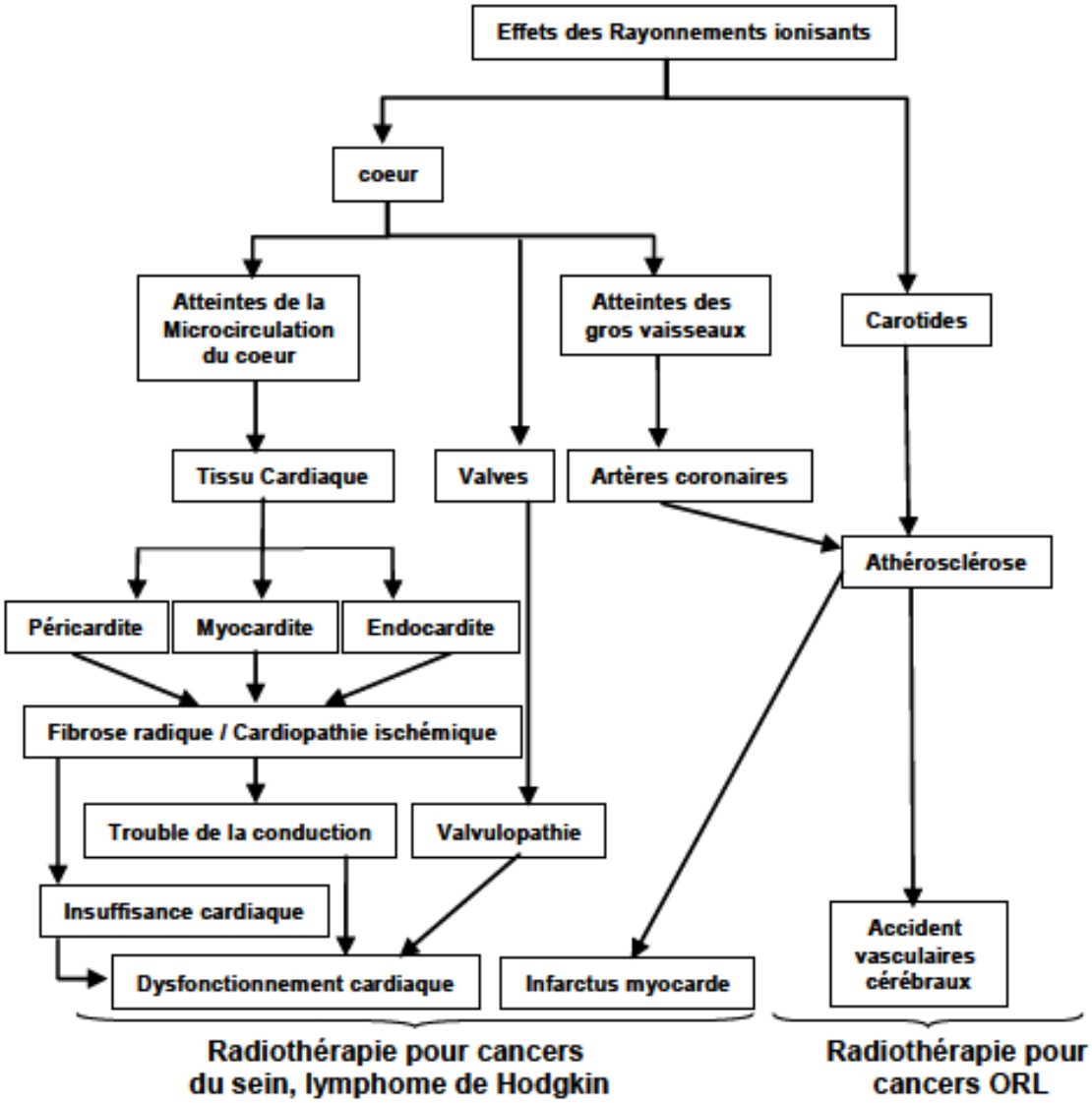


Figure 30 Effets des rayonnements ionisants sur le système cardiovasculaire dans le cadre de traitement par radiothérapie pour les cancers du sein, du lymphome de Hodgkin et des cancers de la sphère ORL.

(Source : Milliat F. et al, Radioprotection (2011))

L'utilisation de modèles *vitro* permet d'approcher plus finement les effets induits par une exposition à un rayonnement ionisant, et notamment les mécanismes induits sur les cellules endothéliales de microvaisseaux. Différents travaux montrent que suite à une exposition à une unique dose d'irradiation, cela entraîne une activation endothéliale, avec une augmentation de l'expression qui se maintient dans le temps des molécules d'adhésion, participant au recrutement des cellules circulantes **(Milliat et al. 2008)**. Il a également été montré que dans un contexte d'irradiation (chez 38 patients traités par radiothérapie pour des adénocarcinomes rectaux), les cellules endothéliales stimulent la prolifération, la migration et un phénotype pro-fibrosant des cellules musculaires lisses vasculaires, suggérant une implication de ces deux types cellulaires dans le développement des lésions radio-induites **(Milliat et al. 2006)**.

B. Exposition à faibles doses

A l'heure actuelle, de nouvelles études conduisent à penser qu'une exposition à faibles doses de RI pourrait entraîner une augmentation du risque cardiovasculaire **(Little et al. 2008)**. Une étude portant sur la cohorte des survivants japonais suite aux bombardements atomiques de 1945 (« *Life Span Study* ») a mis en évidence une augmentation du risque de pathologies circulatoires pour des expositions à des faibles doses. Les résultats de cette étude montrent que 40 ans après exposition, la mortalité causé par des infarctus du myocarde est significativement augmentée chez les personnes ayant reçu une dose unique comprise entre 1-2 mSv **(Preston et al. 2003)**. Une mise à jour de cette étude apporte également une preuve que les radiations peuvent augmenter le taux de pathologies vasculaires à des doses modérées jusque-là jugées comme sécuritaire, entre 0,5 et 2 Gy. Cependant, les résultats pour des doses inférieures à 0,5 Gy ne sont pas statistiquement significatifs et soulignent encore l'incertitude qui réside quant à l'association d'un risque pour des doses inférieures à ce « seuil » **(Shimizu et al. 2010)**.

La recherche dans le domaine des faibles doses et l'induction de pathologies non-cancéreuses telle que l'athérosclérose, a été identifiée comme une priorité scientifique et sociale par la CIPR **(Authors on behalf of ICRP 2012)**, et plus particulièrement concernant les expositions humaines chroniques.

La majorité des études expérimentales disponibles dans ce domaine d'étude ont été réalisées chez des animaux prédisposés (ApoE$^{-/-}$), exposés à faible dose de façon « flash », en irradiation, avec des débits de doses variables.

Dans une étude de 2011, les auteurs ont exposé des souris ApoE$^{-/-}$ à différentes doses et à des débits de doses variables (doses de 25-500 mGy ; débits de doses : « faible » : 1 mGy/min ou « élevé » : 150 mGy/min). Ils montrent qu'une exposition à une simple dose d'irradiation engendre des effets sur le développement de l'athérosclérose chez les animaux exposés, et que les effets ne sont pas linéaires avec la dose reçue, et certains sont transitoires. Les résultats sont difficiles à interpréter, avec des effets à la fois protecteurs, et également délétères, dans les étapes précoces de la pathologie. Généralement, les effets

sont « protecteurs » lorsque le débit de dose est faible. Avec un débit de dose plus élevée, les résultats sont plus contrastés avec des effets tantôt protecteurs, tantôt néfastes (**Table 16**) **(Mitchel et al. 2011)**.

	LDR Early stage	HDR Early stage	LDR Late stage	HDR Late stage
Lesion frequency	↓	↓	↑	—
Lesion size	↓	↓	↓	—
Lesion severity	—	↑	↓	↓
Serum cholesterol	—	↑	↓	—
% Lesion lipid in macrophages	—	↑ ↓	N.D.	N.D.

Table 16 Résumé des mesures observées suite à une exposition à faibles doses. Les flèches indiquent le sens de variation. LDR : Low-dose rate, HDR : High-dose rate. N.D. : non déterminé. Early stage : 2 mois, Late stage : 8 mois

(Mitchel et al. 2011)

Ainsi, la dose n'est pas le seul paramètre impliqué, le « **débit de dose** » est un élément important à prendre en compte quant à l'implication dans les pathologies cardiovasculaires.

Concernant les mécanismes impliqués dans les lésions aux faibles doses, il existe très peu d'études expérimentales, et les résultats sont parfois en désaccord. Certaines études *in vitro* montrent que dans le cas d'une exposition inférieure à 5 Gy, les cellules endothéliales expriment les marqueurs de la dysfonction endothéliale (typiquement : molécules d'adhésion, facteur von Willebrand, TGFβ1, cytokines pro-inflammatoires : IL-6, IL-8) allant

ainsi dans le même sens que dans les études à plus fortes **doses (Gaugler et al. 1997 ; Milliat et al. 2006 ; Milliat et al. 2008)**, suggérant un effet pro-inflammatoire et pro-thrombotique.

D'autres études montrent en revanche le caractère anti-inflammatoire des faibles et très faibles doses d'irradiation, utilisées en clinique pour traiter des pathologies bégnines telles que l'arthrite, les tendinites, les inflammations des membranes synoviales par exemple **(Mücke et al. 2003)**.

Cet effet « bénéfique » pourrait s'expliquer par une baisse de l'interaction des leucocytes avec l'endothélium et une baisse de la production des cytokines pro-inflammatoires **(Rodel et al. 2008)**.

5. Modèles d'étude de l'athérosclérose

Les connaissances des mécanismes génétiques et moléculaires de l'athérosclérose ont progressé significativement grâce aux expérimentations sur des modèles animaux. Près de 100 gènes ont ainsi été identifiés comme ayant une influence sur le développement de cette maladie. L'identification et la validation de tels gènes pourraient permettre de trouver de nouveaux gènes « candidats » pour l'élaboration de nouvelles thérapeutiques.

Le modèle murin est le modèle le plus utilisé *in vivo* pour l'étude de l'athérosclérose humaine.

Une souris sauvage avec un régime « classique »ne développera pas de plaques d'athérome. De véritables progrès ont été faits depuis les années 80 quant à la création de modèles expérimentaux. En interférant sur les conditions du régime alimentaire et sur le génome, l'obtention de souris présentant des signes de la pathologie a été rendue possible.

Les souris WT sont nourries avec un régime riche en gras (high fat 15%), cholestérol (1,25%) et cholate (0,5 %). Ce type de régime dit « *Paigen diet* » est susceptible d'induire la formation de petites lésions athéromateuses, en diminuant la clairance du cholestérol qui voit son taux plasmatique augmenté **(Paigen 1995)**. Les lésions chez ces animaux restent très modérées et c'est pourquoi ce modèle n'est plus si fréquemment utilisé au profit des modèles génétiquement modifiés **(Ando et al. 2005)**.

L'émergence de la technique d'inactivation génique, *via* la recombinaison homologue (modèle Knock-Out – KO), permet de recréer les aspects importants de la pathologie humaine. Les deux modèles expérimentaux principalement utilisés pour étudier l'athérosclérose sont des souris déficientes pour les gènes codant pour l'apolipoprotéine E et/ou le récepteur des LDL. Ces deux protéines sont impliquées dans la clairance du cholestérol et des triglycérides dans la circulation sanguine. Ainsi, des animaux mutés pour ces gènes présentent des taux élevés de cholestérol plasmatiques et vont développer des

plaques athéromateuses plus ou moins étendues sous des conditions alimentaires spécifiques **(Calleja et al. 1999)**.

ApoE est une glycoprotéine plasmatique présente à la surface de la plupart des lipoprotéines, dont les VLDL et les chylomicrons [19] (**figure 31**).

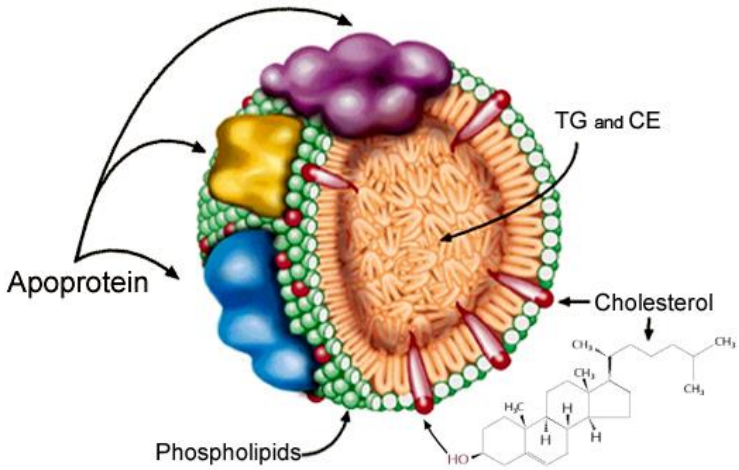


Figure 31 Représentation schématique d'une lipoprotéine.
TG : triglycéride, CE: cholestérol estérifié. *(Source : http://eatingacademy.com)*

Les souris KO pour le gène de l'apolipoprotéine E développent des lésions de façon progressive, avec de nombreuses caractéristiques communes à celles observées chez l'homme **(Nakashima et al. 1994)** (**figure 32**). LDLR est quant à lui présent à la surface des cellules hépatiques, qui lient l'ApoE. L'absence de LDLR entraîne une accumulation de LDL-cholestérol, responsable de la formation des lésions athéromateuses **(Getz et al. 2012)**.

[19] Chylomicrons : lipoprotéines responsables du transport des lipides de l'intestin vers les tissus adipeux.

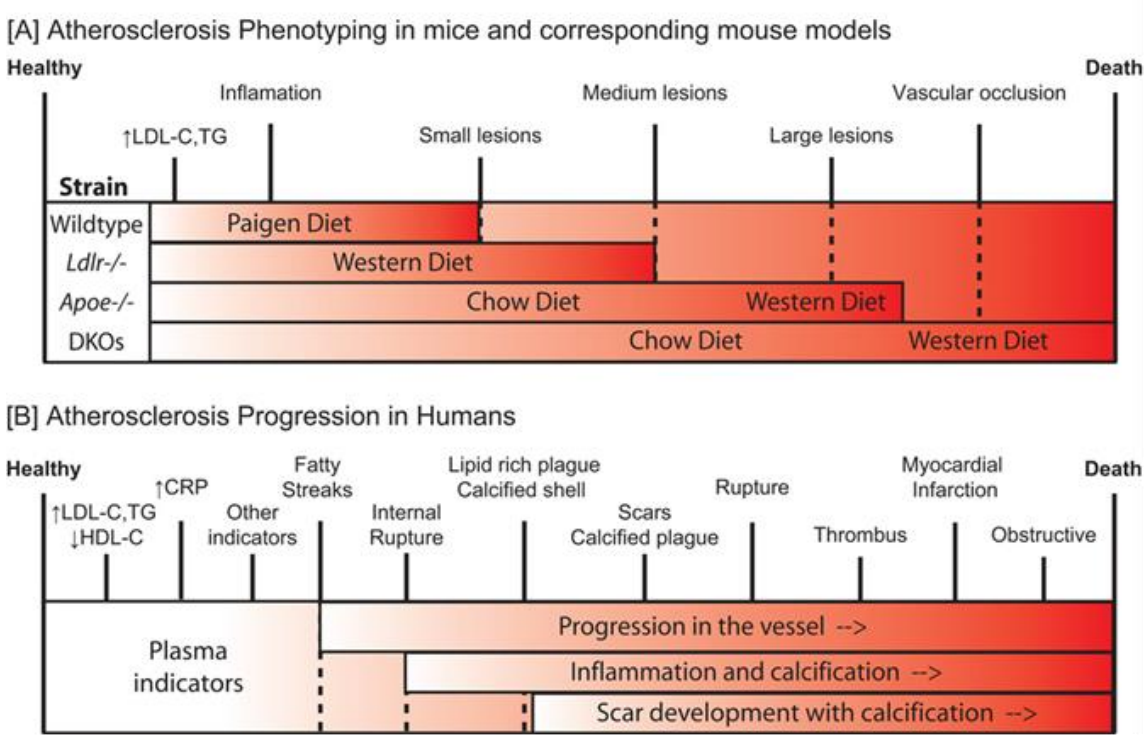


Figure 32 Comparaison de la progression des lésions athéromateuses chez l'animal et chez l'Homme

(Stylianou et al. 2012)

Chez l'homme, les mutations impliquant LDLR et ApoE sont associées à des troubles hyperlipidémiques, incluant l'hypercholestérolémie familiale. Les patients présentant ce type de désordre métabolique voient leur susceptibilité à développer des lésions athéromateuses augmentée.

La **Table 17** dresse un résumé *(non exhaustif)* des différents modèles actuellement utilisés, ainsi que les avantages et les inconvénients de chacun d'entre eux.

Animal modèle	+	-
Lapin	- existence d'une lignée naturellement déficiente en LDL-R - existence d'une lignée naturellement hypertriglycémique - facilités d'élevage - bonne réponse aux régimes enrichi en cholestérol - lignées transgéniques disponibles	- localisation des lésions différentes de celles retrouvées chez l'Homme - cholestérol circulant sous forme HDL - besoin d'élever le taux plasmatique de cholestérol pour induire l'athérosclérose - pas de développement de lésions avancées - pas de développement d'athérosclérose spontanée
Souris	- bien caractérisé sur le plan génétique - facilités d'élevage - temps de génération court - lignées transgéniques disponibles : ApoE-/-, LDLR-/-, DKO...	- athérorésistance - HDL élevé - pas de CETP - difficulté dans les prélèvements/dissections
Rat	- facilités d'élevage - lignées transgéniques disponibles (surexpression CETP humain)	- athérorésistance - HDL élevé - pas de CETP
Hamster	- CETP plasmatique - sévérité des lésions inductibles avec régime approprié - facilités d'élevage	- trop grande variabilité des lésions aortiques
Cochon d'Inde	- cholestérol circulant sous forme LDL - CETP, lipoprotéine lipase, et LCAT - inflammation, augmentation des cytokines aortiques	- pas de développement de lésions avancées - manque d'anticorps disponibles - pas un bon modèle chirurgical
Oiseau	- existence d'une lignée susceptible à l'athérosclérose - localisation et progression des lésions similaires à celles observées chez l'Homme - facilités d'élevage - bonne réponse aux régimes enrichi en cholestérol - temps de génération court - durée de vie relativement longue	- pas Mammifère - pas d'apoE, apoB48 ou de chylomicrons - beaucoup de changements du métabolisme des lipoprotéines au cours de la ponte
Chien	- similarités anatomiques/physiologiques à l'Homme - profil lipoprotéique bien caractérisé - littérature abondante sur l'usage de médicaments/prothèses	- existence d'espèces résistantes - taux HDL élevé - pas de lésions avancées - faible réponse à régime riche en CT - problèmes d'éthique
Porc	- similarités anatomiques/physiologiques à l'Homme - lésions spontanées au niveau de l'aorte abdominale - disponibilité des mini-porcs - plaques avancées vulnérables au niveau carotidien - chirurgie carotidienne + stent	- long régime riche en CT - niveau de base de CT faible - difficulté d'élevage - coûts de maintenance élevés
Primates non-Humains	- + proche de l'Homme - bonne réponse aux régimes enrichis dans certaines espèces - lésions précoces spontanées dans certaines espèces - angioplasties	- déficience rénale entraînant une mort prématurée - sites de lésions variables - peu disponibles - difficulté d'élevage - problèmes éthiques

Table 17 Modèles animaux de l'athérosclérose *(Xiangdong et al. 2011)*

Problématique
&
Objectifs

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

La dissémination environnementale de radio-césium suite aux accidents nucléaires de Tchernobyl et de Fukushima pose une réelle interrogation quant aux conséquences d'une exposition récurrente/chronique à de faibles doses de rayonnements ionisants sur la santé de l'homme. Les inquiétudes des populations soumises à de telles expositions sont tout à faits pertinentes et légitimes.

Dans ce cadre-là, de nombreuses études expérimentales ont été mises en place dans différents laboratoires - dont le LRTOX -, afin de pouvoir apporter des éléments de réponses quant aux effets « biologiques » engendrés/induits suite à une exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants, dans le cadre de situations post-accidentelles.

Dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à étudier les effets d'une exposition chronique à faibles doses sur le système cardiovasculaire, et plus précisément dans un contexte athéromateux. Les conséquences de l'athérosclérose sont à l'origine des deux premières causes de mortalité/morbidité dans les pays industrialisés à l'heure actuelle (OMS, 2012).

Les études épidémiologiques et expérimentales, en cas d'exposition à fortes doses de rayonnement ionisant (exposition accidentelle ou médicale par exemple) montrent que l'athérosclérose pouvait progresser de façon plus importante chez des patients/animaux ayant été exposés à de fortes doses de rayonnement ionisant. Cependant, dans le cadre d'une exposition à faibles doses, trop peu de données sont disponibles. Ce travail de thèse vise donc à apporter de nouvelles connaissances dans le domaine des « faibles doses ».

Les objectifs de ce travail sont d'étudier les effets sous-jacents à une exposition interne chronique à faible dose de rayonnement ionisant, doses comparables à celles retrouvées en territoires contaminés (Tchernobyl), sur la progression de la pathologie athéromateuse.

Pour cela, deux approches ont été mises en œuvre. La première, *in vivo*, s'appuie sur un modèle animal couramment utilisé pour « mimer » les lésions athéromateuses, le modèle de

souris « ApoE$^{-/-}$ ». Les animaux sont exposés *via* l'eau de boisson à des concentrations de césium 137 allant de 4 à 100 kBq.L^{-1}, pendant des durées de 3 à 9 mois. L'objectif est de comprendre dans quelle mesure le césium 137 administré peut influer les paramètres de progression de l'athérosclérose.

La seconde approche, réalisée en parallèle du modèle « *vivo* », afin de compléter les résultats et d'avoir une démarche plus « mécanistique », est une approche « *in vitro* ». Pour ce faire, des cellules humaines ont été exposées à faibles doses de rayonnement ionisant *via* le milieu de culture ou par irradiation externe.

L'objectif de ces expérimentations *vivo* est de permettre d'étudier de façon plus fine les effets induits par une telle exposition au niveau cellulaire, et notamment si la fonctionnalité cellulaire est affectée.

Matériels
&
Méthodes

MATERIELS ET METHODES

I. MODÈLE ANIMAL – EXPÉRIMENTATIONS *IN VIVO*

1. Vue générale du protocole d'exposition des animaux

Le schéma schéma ci-après récapitule ce qui a été réalisé expérimentalement dans cette partie *in vivo* (figure 33) :

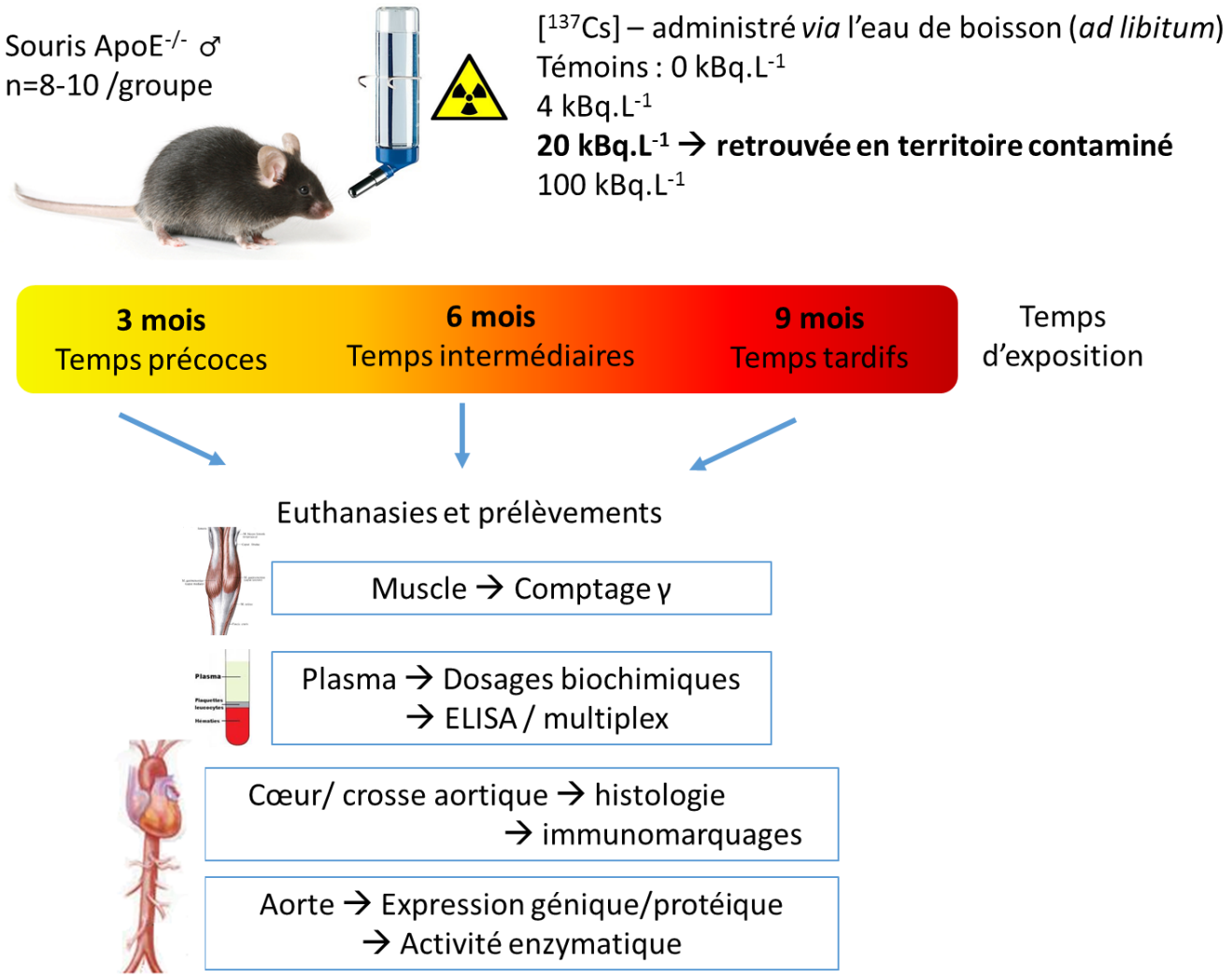


Figure 33 Protocole expérimental général *in vivo*

Une étude précédemment menée au laboratoire a permis de déterminer les doses absorbées par les animaux en fonction du temps **(Bertho, et al. 2010)**. Ainsi, les doses absorbées en fonction des temps d'exposition sont les suivantes (**Table 18**):

	Doses absorbées (en mGy)		
	3 mois	6 mois	9 mois
4 $kBq.L^{-1}$	1,5	3	6
20 $kBq.L^{-1}$	7,5	15	30
100 $kBq.L^{-1}$	37,5	75	150

Table 18 Doses moyennes absorbées *(Bertho et al. 2010)*

2. Prélèvements tissulaires et analyses

A. Prélèvement sanguin

Suite à l'anesthésie des souris, un prélèvement de sang en intra-cardiaque est réalisé. Le sang ainsi collecté est placé à centrifugé pour récupérer le plasma. Cela permettra ensuite de réaliser des analyses biochimiques : profil lipidique, ELISA, multiplex (détaillées dans les sections « Materials and methods » des articles).

B. Prélèvement musculaire

Lors de l'euthanasie des animaux, le muscle gastrocnémien est prélevé et pesé afin de réaliser un comptage de l'activité gamma du césium 137, et ainsi pouvoir s'assurer de la bonne contamination des animaux dans les différents groupes. L'organe ainsi prélevé est placé dans un compteur gamma, le COBRA.

De façon schématique, il s'agit d'un compteur de scintillations muni d'un cristal inorganique d'iodure de sodium, dopé en thallium. Ce cristal émet de la lumière lorsqu'il est touché par un rayon gamma. Plus le rayon est énergique et plus le cristal émet de la lumière. Un photomultiplicateur au sein du dispositif permet aussi d'amplifier le signal reçu, qui est ensuite transmis à un lecteur **(figure 34)**.

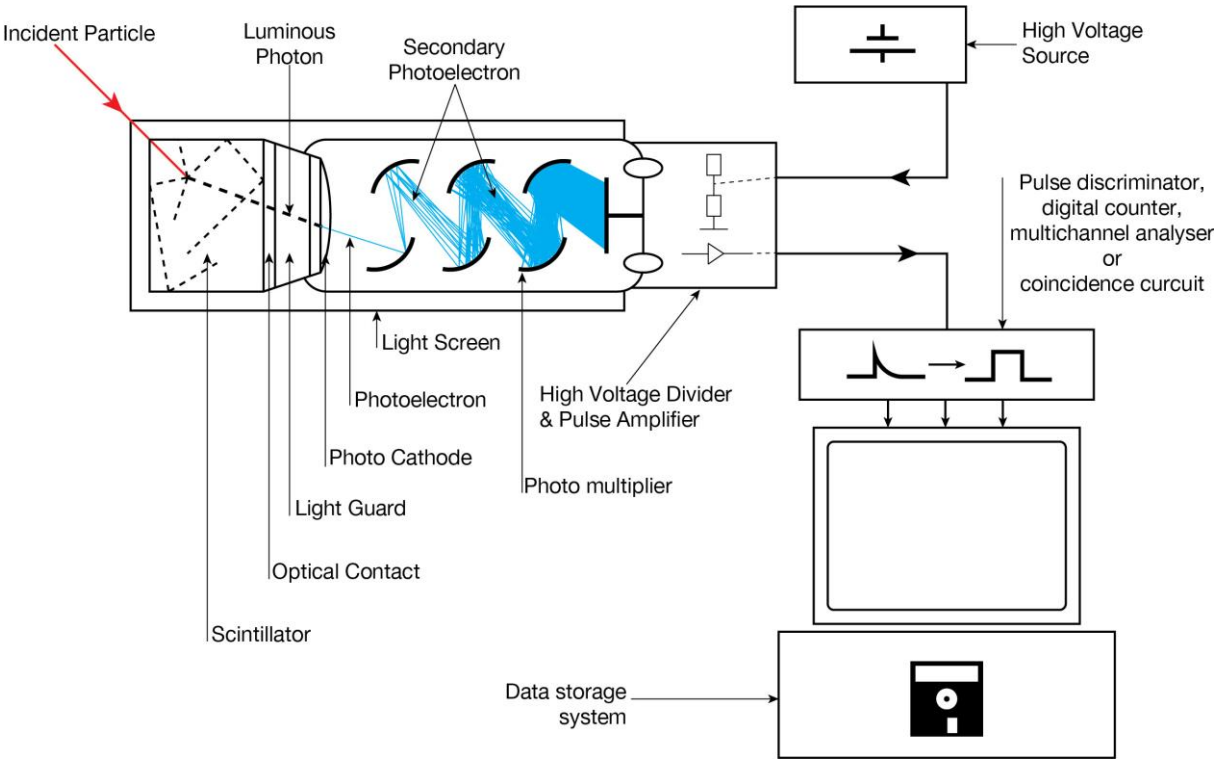


Figure 34 Schéma d'un compteur de scintillations *(Source : Manticorp)*

C. Prélèvements et analyses aortique et cardiaque

Le cœur ainsi que l'aorte sont soigneusement disséqués. Le cœur et une portion de l'aorte sont placés dans des cryo-moules adéquats, et conservés dans de l'OCT (Optimum Cutting Temperature) en vue de réaliser des études histologiques/immunohistochimiques après découpe au cryostat (coupes de 7 µm d'épaisseur).

Ainsi aux temps 6 et 9 mois, le cœur, et plus précisément la zone du sinus aortique sera étudiée. Différentes techniques seront réalisées pour mettre en évidence différents paramètres :

- **Coloration à l'huile rouge** : pour mettre en évidence les dépôts lipidiques au niveau des plaques, et de pouvoir ainsi évaluer la taille de celles-ci ;
- **Coloration picro Sirius** : afin de mettre en évidence le collagène, indice de stabilité des plaques ;
- **Immunomarquages** : CD68 pour les macrophages ; αSMA pour les cellules musculaires lisses ; DHE pour les anions superoxydes ;
- **Activité enzymatique de MMP** (gélatinase / collagénase)

Le reste de l'aorte est divisées en 2 parties, une consacrée aux analyses génétiques et l'autres pour les analyses protéiques.

II. CULTURE CELLULAIRE – EXPÉRIMENTATIONS *IN VITRO*

1. Human Aortic Smooth Muscle Cells (HAoSMC)

Toutes les cellules sont cultivées dans une étuve à 37°C – 5% de CO_2.

A. Origine des cellules

Les HAoSMC pour « Human Aortic Smooth Muscle Cells » proviennent de chez PromoCell (réf. C-12533), sont cryo-preservées en passage P2.

Le milieu de culture utilisé est le milieu « Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 » (réf. C-22062), dont la composition après ajout du « supplément » est précisée sur la **Table 19**.

▪ Fetal Calf Serum	0.05 ml / ml
▪ Epidermal Growth Factor (recombinant human)	0.5 ng / ml
▪ Basic Fibroblast Growth Factor (recombinant human)	2 ng / ml
▪ Insulin (recombinant human)	5 µg / ml

Table 19 Composition du milieu de culture des HAoSMC

Les HAoSMC sont cultivées en plaque 96 puits pour l'expérimentation de « contamination interne ». Dans ce dernier cas, lorsque les cellules atteignent 80% de confluence, elles sont repiquées dans de nouvelles flasques (typiquement 1 -> 3).

B. Protocole de contamination

Les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits, à raison de 25 000 cellules par puits (5 puits/ condition de contamination).

4 doses de « contamination » ont été établies : 0 mGy, 20 mGy, 100 mGy et 1 Gy.

La période du ^{137}Cs est de 30 ans, ce qui est largement supérieur au temps d'exposition des cellules (72h), et celle du Baryum-137m de 2,5 min. On peut poser les hypothèses que l'activité du césium 137 est constante au cours de l'expérimentation, et qu'il y a un équilibre à 100 % entre le ^{137}Cs et le ^{137m}Ba.

Ainsi, grâce à une source de chlorure de césium (Cerca CEA – 900 KBq), nous avons préparé les milieux adéquats de la façon suivante (**Table 20**) :

Dose (mGy)	Volume ClCs (µL)	Volume de milieu (µL)
0	0	1600
20	0,2	1599,8
100	1,1	1598,9
1 000	10,5	1589,5

Table 20 Préparation des milieux de culture contaminés au césium 137

Les milieux « contaminés » ainsi préparés sont répartis dans les plaques 96 puits, à raison de 200 µL / puits.

Afin de s'affranchir d'éventuelles contaminations, les cellules « non-contaminées » sont placées dans une étuve différente de celles des cellules « contaminées ». De même que pour les cellules « contaminées », les puits sont répartis sur différentes plaques (1 plaque/condition) et isolées les unes des autres avec des plaques plombées.

C. Analyses

i. Etude de l'expression génique

L'extraction de l'ARNm messager ainsi que l'étape de RT sont réalisées grâce au kit « Power SYBR® Green Cells-to-Ct™ Kit » (Life Technologies, Cat. N°4402954), selon les instructions du fournisseur.

La **Table 21** présente les différents gènes dont l'expression a été étudiée.

		Références	
	Gène	réf cat. Life Technologies	réf séqu.
« Inflammation »	MCP-1	Hs00234140_m1	NM_002982.3
	IL-6	Hs01075666_m1	NM_000565.3
« Stabilité »	MMP-1	Hs00899658_m1	NM_001145938.1
	MMP-2	Hs01548727_m1	NM_001127891.1
	col3a1	Hs00943809_m1	NM_000090.3
	col1a2	Hs00164099_m1	NM_000089.3
Prolifération	PCNA	Hs00427214_g1	NM_002592.2
Gènes de référence	GAPDH	Hs02758991_g1	NM_001256799.1
	HPRT	Hs02800695_m1	NM_000194.2

Table 21 Références gènes expérimentations *in vitro*

ii. Etude des cytokines relarguées dans le milieu

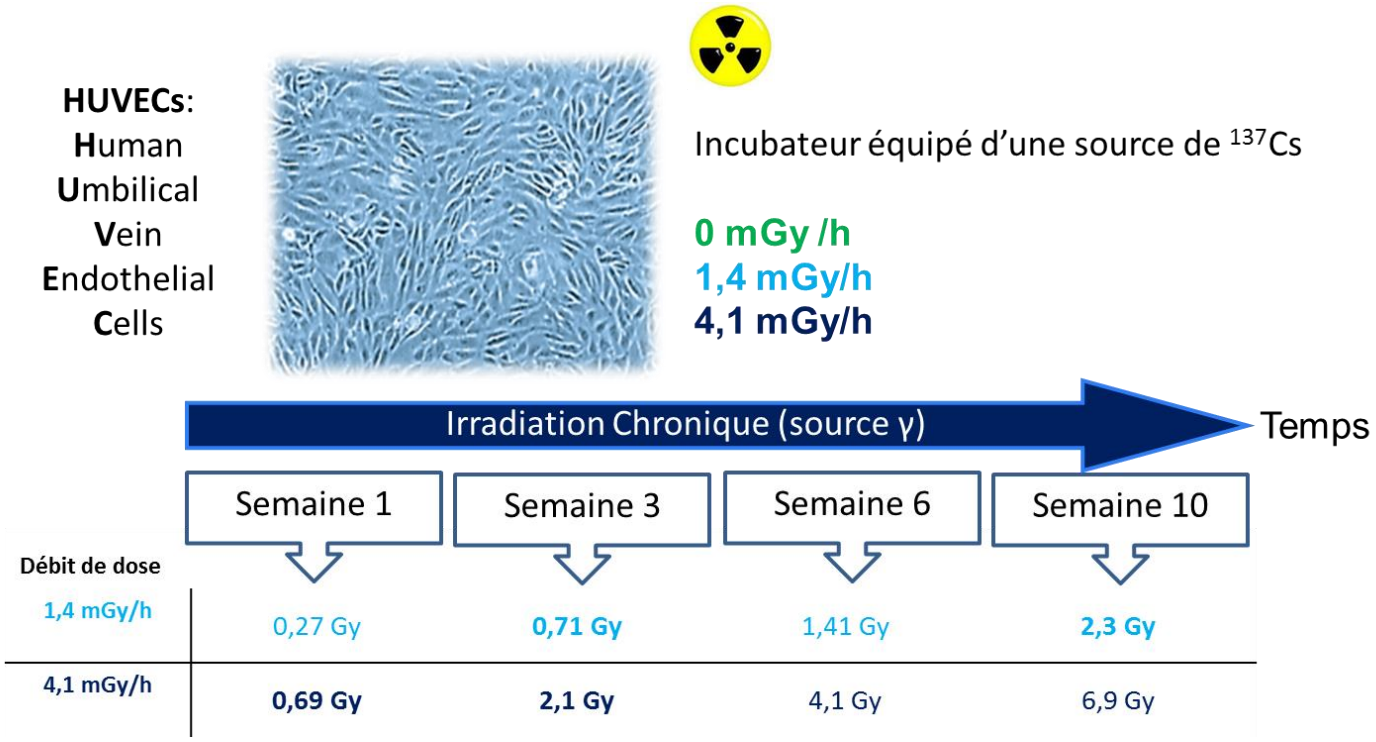
Les surnageants de culture sont récupérés et permettent ainsi de réaliser différents dosages, afin d'étudier les molécules relarguées par les cellules suite à une exposition au ^{137}Cs.

Ainsi, nous avons réalisé par la technique d'ELISA, le dosage de MCP-1 (R&D Systems, DY279) et d'IL-6 (R&D Systems, DY206) à partir des surnageants récupérés en fin d'expérimentation, après 72h d'exposition (dilution : 1/50e), selon les instructions du fournisseur.

2. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Concernant les expérimentations réalisées sur ce type cellulaire, elles sont décrites dans la section « Materials and Methods » de l'article dans la seconde partie des résultats.

Cette section présente un aperçu global du protocole qui a été suivi (**figure 35**). Les HUVECs sont placées dans des incubateurs possédant des sources de césium 137 permettant de réaliser des irradiations chroniques à deux débits de dose différents (1,4 et 4,1 mGy/h).



A chaque temps :

- ➔ **Extraction ARNm + protéines** → RT-PCR, Western Blot : expression des molecules d'adhésion
- ➔ **Récupération des surnageants** → ELISA : cytokines inflammatoires
- ➔ **Fonctionnalité cellulaire** → matrigel

Figure 35 Protocole expérimental - *in vivo* irradiation chronique à faibles doses

Résultats

RESULTATS

Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse s'articuleront en deux parties.

Tout d'abord seront présentés les résultats découlant de l'étude *in vivo*, et sera subdivisée en deux sous-parties correspondant aux articles qui ont été soumis.

La seconde partie quant à elle abordera les résultats des expérimentations *in vitro*, avec les résultats des expérimentations réalisées sur des cellules endothéliales humaines irradiées à faibles doses/faibles débits de doses (ayant fait l'objet d'une publication) ainsi que les résultats tout à fait préliminaires obtenus sur les cellules aortiques lisses aortiques humaines, contaminées au césium 137 par le milieu de culture.

RESULTATS *IN VIVO*

I - EFFETS D'UNE EXPOSITION À COURT TERME AU CÉSIUM 137 *IN VIVO* DANS UN MODÈLE D'ATHÉROSCLÉROSE MURIN APOE$^{-/-}$

L'objectif de cette première étude était de mettre en évidence les effets engendrés par une exposition à faibles doses de rayonnement ionisant pendant un temps court, dans un modèle murin de prédisposition à l'athérosclérose.

Des souris ApoE$^{-/-}$ ont ainsi été exposées pendant 3 mois à de faibles doses de césium 137. De façon intéressante, malgré qu'à ce temps d'exposition les souris ne développent pas encore de plaques d'athérome, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'expression génique de certaines cytokines inflammatoires, ainsi que d'un marqueur de l'activation endothéliale qu'est VCAM-1. L'augmentation concomitante de ses marqueurs est à mettre en parallèle avec une augmentation significative de l'épaisseur de la paroi aortique, chez les animaux exposés à la plus forte concentration de césium 137.

Ces résultats suggèrent qu'une exposition chronique interne à faibles doses de césium 137 induit la mise en place d'une réaction de l'endothélium et une réaction inflammatoire précoce associée à un remodelage aortique chez des animaux prédisposés à la pathologie.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis dans la revue « Atherosclerosis » (janvier 2015).

Effects of a sub-chronic internal exposure to low dose of ^{137}Cs on vascular remodelling in ApoE$^{-/-}$ mice

[1]C. Le Gallic, [1]F. Sokhona, [1]JM. Bertho, [1]P.Lestaevel, [2]S. Lehoux, [1]T.G. Ebrahimian

1. Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, Laboratoire de RadioToxicologie Expérimentale, 92262, Fontenay-aux-Roses, France.

2. Mc Gill University, Division of experimental medicine, Montreal, Canada

Short title: Low dose exposure to ^{137}Cs and very early stages of atherosclerosis

Corresponding author:
Dr. Teni Ebrahimian
Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de RadioToxicologie Expérimentale
31 avenue de la Division Leclerc
92262, Fontenay-aux-Roses, France
Phone: +33(1) 58 35 70 07
Fax: +33(1) 58 35 84 67
E-mail : teni.ebrahimian@irsn.fr

Abstract

Objective: Vascular remodelling emerged as an important compensatory process in human atherogenesis which crucially contributed to the determination of lumen obstruction. It was previously shown that exposure to high doses of ionizing radiation can promote atherosclerosis. However, concerning low dose range, epidemiological studies highlighted that an excess risk of cardiovascular disease can associate with moderate and low dose radiation. There is a real questioning concerning the effect of low dose ionizing radiation exposure and the development and progression of cardiovascular diseases. This may be due in part to the multifactorial origin of those pathologies. In this study, we evaluated the effect of an internal chronic exposure to low doses of a γ emitter (^{137}Cs) on the very early stages of atherosclerosis in $ApoE^{-/-}$ mice.

Methods: 7-8 weeks $ApoE^{-/-}$ male were chronically exposed through drinking water to 4 $kBq.L^{-1}$, 20 $kBq.L^{-1}$ or 100 $kBq.L^{-1}$ of ^{137}Cs during 3 months. Those concentrations correspond to the range of concentrations found in contaminated territories. We evaluated inflammatory profile, aorta thickness and oxidative stress balance.

Results: For the animals exposed to 100 $kBq.L^{-1}$, TNF-α mRNA aortic expression is significantly decreased, whereas IFN-γ gene expression is significantly increased, such as VCAM-1 as compared with non-exposed animals. In this group, we also observed a significant increase in aorta thickness, together with a significant increase in collagen mRNA expression compared with non-exposed animals. Evaluation of mRNA expression of key actor involved in cellular redox control showed both an increase in “pro” and “anti” oxidative mRNA enzymes expression.

Conclusion: These results suggest that a sub-chronic internal low dose exposure to ^{137}Cs could induce *in vivo* a pro-inflammatory profile associated with a vascular remodelling.

Key words: atherosclerosis, low dose ionizing radiation, internal exposure, $ApoE^{-/-}$

Abreviations

^{137}Cs: cesium 137

Bq: Becquerel

CAT: catalase

CVD: cardiovascular disease

CRP: C-reactive protein

ECM: extracellular matrix

ED: endothelial dysfunction

DHE: dihydroethidium

GPx: Glutathione peroxidase

Gy: Gray

ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1

IFN-γ: interferon γ

MAPK : Mitogen-Activity protein kinase

MCP-1: monocyte chemotactic protein 1

ROS: Reactive Oxygen Species

SMC: smooth muscle cells

TNF-α: tumor necrosis factor α

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1

Introduction

Arterial remodelling is a potentially important component in atherogenesis aimed at delaying the development of significant lumen compromise. Vascular remodelling emerged as an important compensatory process in human atherogenesis which crucially contributed to the determination of lumen obstruction **(1)**. Indeed vascular remodelling is the result of a complex interplay of alterations in vascular tone and structure, including changes in both the cellular and non-cellular components that depend on the pathological condition, inflammation, endothelial dysfunction and extracellular matrix synthesis or degradation **(2-4)**. Generally activation of NADPH oxidase is a central mediator of the pathological effects contributing to enhanced production of ROS, activation of pro-inflammatory transcription factors and vascular injury and ultimately contribute to vascular SMC proliferation, vascular remodelling and dysfunction **(5-8)**.

High dose radiation on coronary, carotid and other large arteries during radiotherapy process induces tissue damage resulting in an increased risk of circulatory diseases. Reports in the literature have clearly demonstrated the direct association of cardiovascular diseases and radiation therapy in the treatment of Hodgkin's disease **(9)**, breast cancer **(10)**, and peptic ulcer **(11)** during long-term follow-up period. The risk factors for cardiovascular disease, such as hypertension **(12)** and hypercholesterolemia **(13)** were also increased in atomic-bomb survivors. These studies showed that single doses to the whole body from 0 to 4 Gy, increased by 14 % per Gy the cardiovascular disease risk **(13)**.

There is a real questioning on the effect of low doses exposure on the development of CVD such as atherosclerosis or other vascular alterations which could influence the development of atherosclerotic plaques that may impact radioprotection.

Epidemiological evidences for an effect of low doses remains suggestive rather than persuasive. It is therefore unclear from human studies if an association between cardiovascular diseases and radiation exposure at low doses exists. If such an association is real, it is also unclear whether there is a general radiation–induced change in risk for the

whole population or any changes are associated with particular dietary circumstances, radiation quality or sensitive subgroups. In fact, in epidemiological studies concerning low doses, individual cardiovascular risk factors were not taken into account. The main interrogations are if and how low doses could elevate the risk of cardiovascular disease, as reported by some epidemiological studies, and whether mechanisms implicated differ from high-doses effects.

Furthermore, some experimental animal studies have shown that single doses of more than 5 Gy can accelerate the formation of atherosclerotic lesions **(14)**. The currently admitted underlying biological mechanism is a high level of cell death and ensuing pro-inflammatory effect **(15)**. Moreover, at high acute radiation dose (>10 Gy) a variety of other well-established effects are observed, in particular damages to heart structures and to vessels **(14)**.

A recent study reported that a single dose of 25-500 mGy can have a significant non-linear impact on the development of atherosclerosis in genetically predisposed mice ($ApoE^{-/-}$) fed with a normal low fat diet. In this study, they showed that a low-dose-rate exposure was protective, whereas a high-dose-rate exposure was associated with both protective and detrimental effects **(16)**. However, this study dealt with single external exposures, and to our knowledge, there is no available study concerning the effect of chronic intake of radionuclides on atherosclerosis development and progression.

In fact, the question of low-dose chronic exposure effects in humans arises in the aftermath of situations where large amounts of radionuclides were released in the environment, such as the Chernobyl or the Fukushima accidents. Many years later, ^{137}Cs, a beta and gamma radiation emitter with a half-life of 30 years remains the main radionuclide detectable in the environment **(17).** As a result, a large human population living in contaminated countries chronically ingested small amounts of ^{137}Cs **(18)**. The consequences of a chronic ingestion of low quantities of ^{137}Cs over a long period of time on cardiovascular diseases progression are still unknown.

^{137}Cs is considered as a radionuclide with low chimiotoxicity but high radiotoxicity, mainly linked to the emission of ß and γ rays during its disintegration **(19).** However, ^{137}Cs has a

biological behaviour close to that of potassium **(20)** which sustains the hypothesis that ^{137}Cs could affect the cardiovascular system. In line with this hypothesis, our group have shown that a chronic low dose exposure with ^{137}Cs decreases arterial mean blood pressure and increases angiotensin converting enzyme and brain natriuretic peptic in the atria of the rat **(21)**.

The objective of the present study was to investigate experimentally the effects of chronic internal low doses exposure to ^{137}Cs on vascular inflammation and remodelling in $ApoE^{-/-}$ mice. $ApoE^{-/-}$ mice are homozygous null for a functional ApoE gene on a C57BL/6J background. Apolipoprotein E acts as the main ligand mediating removal of cholesterol enriched chylomicron and VLDL remnants from the blood stream and plays an important role in lipoprotein metabolism. These mice develop atherosclerosis when fed with a normal low fat diet. The morphological features of early-stage lesions in $ApoE^{-/-}$ mice are very similar to those found in humans **(22)**.

Animal were chronically exposed with 20, 100 or 500 Bq/animal/day of ^{137}Cs administrated through drinking water. Our dosing range (4-100 $kBq.L^{-1}$) corresponds to 5 times less and 5 times more than the concentration of 20 $kBq.L^{-1}$ that was used in previous studies **(23)**. Most importantly, the ingestion rate are close to the estimated ingestion of 20 to 2 100 $Bq.day^{-1}$ that were calculated to be ingested by humans living in contaminated areas in Chernobyl, with large variations according to geographical location and individual habits **(24)**.

Materials and Methods

Animals

7-8 week-old ApoE$^{-/-}$ male mice were obtained from Charles River Laboratory. Each group comprised 10 animals. Animals were maintained in a specific-pathogen-free environment and monitored daily. All experiments and procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as published by the French regulations for animal experiments (Ministry of Agriculture Order No. B92-032-01, 2006) according to European Directives (86/609/CEE), and approved by the local ethical committee of the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (Agreement Number: P10-11 and thematic number: T29).

^{137}Cs exposure

Animals were separated into 4 groups : ApoE$^{-/-}$ mice receiving either tap water (*ie* non-exposed group) or tap water supplemented with 4, 20 or 100 kBq.L^{-1} of ^{137}Cs (^{137}CsCl final concentration 5x10-9 M, CERCA-LEA, Pierrelatte, France), during 3 months.

^{137}Cs measurement

Gamma spectrometry with a gamma counter (Packard Cobra Model II D5003) was used to measure ^{137}Cs activity. Gastrocnemius muscle was weighted and counted for 60 minutes, and the count was related to its weight. The radiation dose received by the muscle was calculated according to models developed for rodents **(25)**, as previously described **(26)**.

Blood sampling and analysis

Mice were terminally anesthetized by intraperitoneal injection of ketamin/xylazin (Ketamine 500 Virbac France, Rompun 2% Bayer). Blood was collected by intracardiac puncture with a heparinised syringe. Blood was centrifuged for 8 minutes at 800 *g* and plasma was harvested and frozen for subsequent analysis. Plasma cholesterol and low and high density lipoprotein (LDL and HDL) levels were determined (BRAHMS, cholesterol: 981813, LDL: 981656, HDL:

981823) with an automated Konelab 20 (Biological Chemistry Reagents, Thermo Electro Corporation, France).

Tissue collection

Hearts (including the aortic root) were separated from the aorta, embedded in Optimum Cutting Temperature medium (OCT, Sakura, Fineteck Europe), and snap-frozen on a metal plate that was cooled with liquid nitrogen. Cryosections of 7 µm thickness were cut from the origin of the aortic root throughout the aortic sinus, for histological and immunohistochemical analysis. Aortas were excised from the aortic arch to the femoral bifurcation. The thoracic and abdominal aortas were separated for gene and protein expression analysis.

Gene expression

Total RNA from thoracic aortas was extracted using TRI Reagent solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). RNA quality was checked by measuring the ratio of optical densities at 260 and 280 nm. Real-time qPCR (RT-qPCR) was used to analyze the mRNA levels of inflammatory cytokines and adhesion molecules (TNF-α, IFN-γ, MCP-1, CRP, ICAM-1 and VCAM-1). Oxidative stress balance was evaluated by mRNA expression of pro and anti-oxidant enzymes (NADPH subunits P47 and P67, CAT and GPx). The mRNA expression of collagen (col3a1 and col1a2) was also evaluated. RT-qPCR were performed with an Abi Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using SYBR Green (Applied Biosystems). All samples were normalized to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to analyze the results **(27)**. All RT-qPCR results are expressed as mean ± SEM, and compared to expression levels of non-exposed group, which is set at 1. Primers were designed using Primer-BLAST software (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Sequences of the forward and reverse primers used are listed in **Table 1**.

Gene	Gene bank accession	Strand	Sequence
CAT	NM_009804.2	Sens	5'- AGCGACCAGATGAAGCAGTG -3'
		Antisense	5'- GGGTGACCTCAAAGTATCCAAA -3'
COL1	NM_007743.2	Sens	5'- AGTCGATGGCTGCTCCAAAA -3'
		Antisense	5'- AGCACCACCAATGTCCAGAG -3'
COL3	NM_009930.2	Sens	5'- TCCCCTGGAATCTGTGAATC-3'
		Antisense	5'- TGAGTCGAATTGGGGAGAAT -3'
GAPDH	NM_001289726.1	Sens	5'- CCCCAGCAAGGACACTGAGCAAG -3'
		Antisense	5'- TGGGGGTCTGGGATGGAAATTGTGA -3'
GPx	NM_008160.6	Sens	5'- GGGACTACACCGAGATGAACG -3'
		Antisense	5'- TCCGCAGGAAGGTAAAGAGC -3'
HO-1	NM_010442.2	Sens	5'- CTGTGAACTCTGTCCAATG -3'
		Antisense	5'- AACTGTGTCAGGTATCTCC -3'
HPRT	NM_013556.2	Sens	5'- TCAGTCAACGGGGGACATAAA - 3'
		Antisense	5'- GGGGCTGTACTGCTTAACCAG - 3'
ICAM-1	NM_010493.2	Sens	5'- TTCTCATGCCGCACAGAACT -3'
		Antisense	5'- TCCTGGCCTCGGAGACATTA -3'
IFN-γ	NM_008337.3	Sens	5'- TCTGGGCTTCTCCTCCTGCGG -3'
		Antisense	5'- GGCGCTGGACCTGTGGGTTG -3'
MCP-1	NM_011333.3	Sens	5' GCACCAGCACCAGCCAACTCT -3'
		Antisense	5'- TGGATGCTCCAGCCGGCAACT -3'
P47	NM_198326.2	Sens	5'- GTACGACACGATCCAACGCT-3'
		Antisense	5'- CGTATCCTCGAGCCTGCTACT -3'
P67	NM_010877.4	Sens	5'- AAGCCGGTCACGGTCAAGT-3'
		Antisense	5'- TCCTGGCCTCGGAGACATTA -3'
TNF-α	NM_013693.1	Sens	5'- GACAAGGCTGCCCCGACTA -3'
		Antisense	5'- AGGGCTCTTGATGGCAGAGA -3'
VCAM-1	NM_011693.3	Sens	5'- AAGCCGGTCACGGTCAAGT -3'
		Antisense	5'- GGTCACCCTTGAACAGATCAATC -3'

Table 1: Primers sequences used for RT-qPCR
Primers were designed using Primer BLAST, a tool to design primers for PCR. In our experiments, GAPDH and HPRT were amplified and used as housekeeping genes.

VCAM-1 plasmatic levels

We assessed VCAM-1 concentration in plasma by ELISA, according to manufacturer's instructions (VCAM-1, DuoSet DY643, R&D Systems). Optical Density was read at 450 nm.

VCAM-1 and aorta thickness

Aortic VCAM-1 immunostaining was performed (Millipore CBL1300, 1/100^{e}). Aorta intima-media thickness was measured after a hematoxilin staining and using dedicated software (Histolab, GT Vision LTD, UK).

Superoxide staining

Superoxide anions production in the aorta was evaluated with a Dihydroethidium staining (DHE, 2 µM; Molecular Probes) staining on aorta cryosections (7 µm). DHE is a superoxide indicator that intercalates within the cell's DNA, staining its nucleus a bright red fluorescence. Dihydroethidium was applied during 30 minutes at 37°C. For negative control, sections were incubated with PBS 1X only. A qualitative analysis was performed giving score from "+" (low fluorescence staining) to "+++" (strong florescence staining).

Statistical Analysis

Values were tested for normal distribution and variance. When the data were normally distributed and had equal variance, a Student t-test was made to compare exposed and non-exposed animals results. Data not normally distributed or with unequal variances were compared using the Mann-Whitney Rank Sum Test. Statistical software Sigma Plot 11.0 (SPSS, France) was used for statistical analysis. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant. All results are expressed as means ± SEM with n=10 animals per group.

For all staining and immunohistochemistry procedures, 5-7 cryosections per animal were evaluated and averaged, yielding n=1. Plaques from a minimum of n=5 animals/group were quantified for assessment of each parameter. Images were acquired using an Axiophot (Zeiss, Germany) and analyzed using Histolab software (GT Vision LTD, UK). Slides were independently examined on a blinded basis.

Results

3 months low doses exposure has no effect on animal general health parameters and lipid concentrations in the plasma

^{137}Cs activity in the skeletal muscle of animals, where it accumulates preferentially, increased proportionally to ^{137}Cs intake as expected (**fig. 1**). The resulting of absorbed radiation doses due to ^{137}Cs ingestion were calculated as previously described **(Bertho 2012)** and were 1,5 mGy, 7,5 mGy and 37,5 mGy after 3 months exposure with 4, 20 and 100 kBq.L^{-1} of ^{137}Cs respectively.

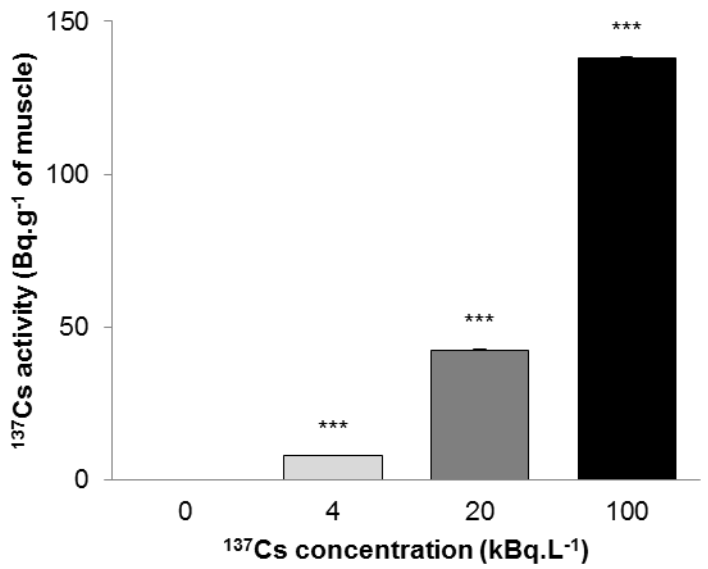


Figure 1: ^{137}Cs activity in the skeletal muscle after 3 months chronic internal ^{137}Cs exposure

Measurement of ^{137}Cs activity allows us to validate our experimental model, showing ^{137}Cs activity and consequently absorption in skeletal muscle is proportional to ^{137}Cs intake. ^{137}Cs activity measured by gamma spectrometry have shown a concentration dependant increase in the skeletal muscle in ApoE$^{-/-}$mice. Results are expressed as mean ± SEM of n=10 per group. ***: $p<0.001$

The mean of body weight, food intake and water consumption per week and per animal is increased along the experiment but ^{137}Cs exposure does not have any influence on these parameters in each groups *(data not shown)*.

Plasma concentration of total cholesterol, HDL and LDL is not modified in ApoE$^{-/-}$ contaminated animals as compared with non-exposed group. Ingestion of different low doses of ^{137}Cs during 3 months had no effect on plasma lipids concentration in ApoE$^{-/-}$ mice (**Table 2**).

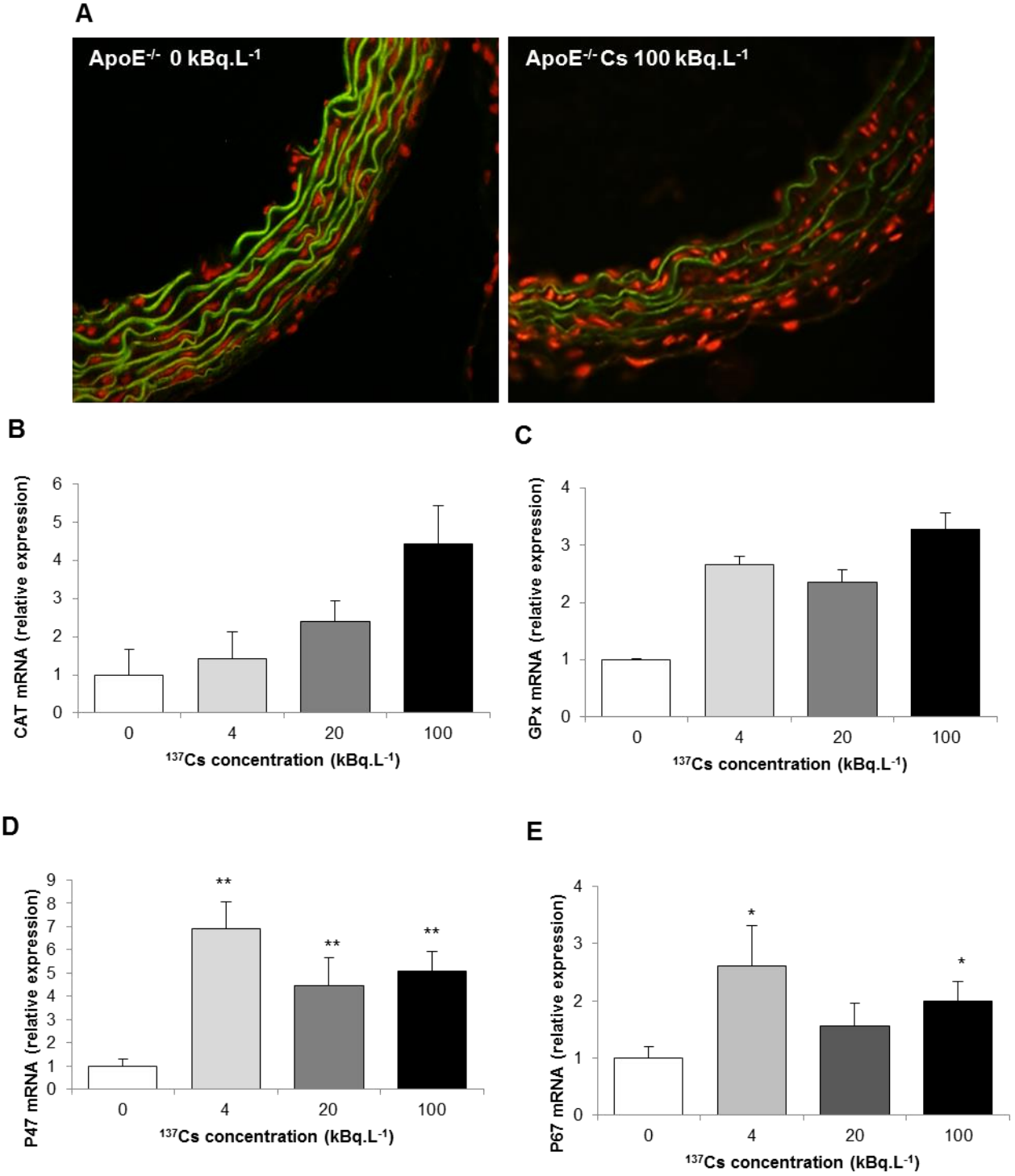
		^{137}Cs concentration (kBq.L^{-1})			
		0	4	20	100
Lipid parameters	**HDL** (mmol/l)	3,11 ± 0,22	3,2 ± 0,10	2,92 ± 0,24	2,75 ± 0,10
	LDL (mmol/l)	9,67 ± 0,62	10,1 ± 0,41	9,07 ± 0,57	8,89 ± 0,24
	Cholesterol (mmol/l)	12,6 ± 0,83	13,0 ± 0,66	12,4 ± 0,41	12,0 ± 0,43

Table 2: Lipid parameters following 3 months chronic exposure to ^{137}Cs
^{137}Cs addition in drinking water did not influence cholesterol, HDL and LDL concentrations in each group. Results are expressed as mean ± SEM.

3 months low doses exposure has no effect on oxidative stress balance on the aorta

The evaluation of superoxide anion production within the aorta, detected by dihydroethidium (DHE) staining, did not reveal differences among the different exposed or non-exposed groups (**fig. 2A**).

We assessed anti-oxidant enzymes mRNA aortic expression, Gluthatione Peroxydase (GPx) and Catalase (CAT). GPx and CAT expression is not modified whatsoever the group. We noticed a non-significative increase for both GPx and CAT in the ApoE$^{-/-}$ group exposed to 100 kBq.L^{-1} compared to non-exposed animals (**fig. 2B and 2C**). On the other hand, the pro-oxidant NADPHox subunits, P47 and P67mRNA expression is significantly increased for exposed animals after 3 months compared with non-exposed animals (for P47 : 0 kBq.L^{-1}: 1.00 ± 0.29; 4 kBq.L^{-1} : 6.92 ± 1.13; 20 kBq.L^{-1} : 4.46 ± 1.2; 100 kBq.L^{-1} : 5.08 ± 0.86. For P67: 0 kBq.L^{-1}: 1.00 ± 0.2; 4 kBq.L^{-1}: 2.61 ± 0.71; 20 kBq.L^{-1}: 1.56 ± 0.4; 100 kBq.L^{-1} : 1.99 ± 0.35) (**fig. 2D and 2E**).

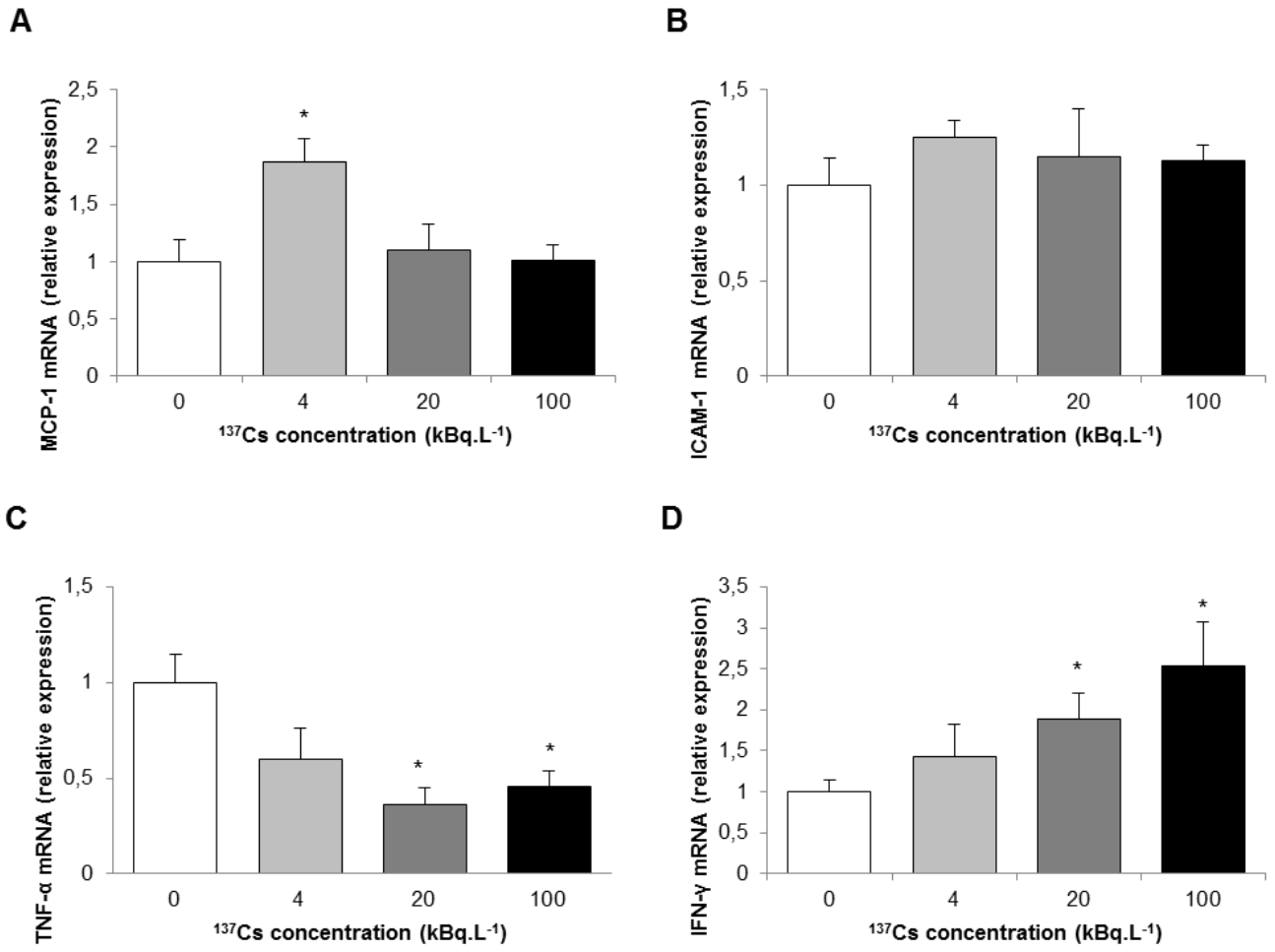


<u>Figure 2</u>: Oxidative stress enzymes expression and ROS production in the aorta following 3 months internal exposure to ^{137}Cs

ROS production was evaluated in aorta by a DHE staining on aorta cryosections (7 µm) (A). Qualitative analysis giving score from "+" (low fluorescence staining) to "+++" (strong florescence staining) did not revealed a strong difference of DHE staining after 3 months ^{137}Cs chronic internal exposure (Magnification x 100) *(data not shown)*. Catalase (CAT) (B), Gluthatione Peroxydase (GPx) (C) and NADPH oxidase subunits : P47 (D) and P67 (E) mRNA expression in aorta. For P47 and P67, expression is significantly increase for ApoE$^{-/-}$ 100 kBq.L^{-1} compared to ApoE$^{-/-}$ 0 kBq.L^{-1}. Results are expressed as mean ± SEM comparing to non-exposed animal. *: $p<0,05$; **: $p<0,01$.

3 months low doses exposure decreases TNF-α and increases IFN-γ

We analysed by RT-qPCR the aorta gene expression of inflammatory cytokines involved in atherosclerosis development and progression: MCP-1, TNF-α, ICAM-1 and IFN-γ. Genomic aorta expression of MCP-1 is significantly increased at 4 $kBq.L^{-1}$ compared to non-exposed group, but not at the highest ^{137}Cs concentration (0 $kBq.L^{-1}$: 1.00 ± 0.19; 4 $kBq.L^{-1}$: 1.87 ± 0.2; 20 $kBq.L^{-1}$: 1.1 ± 0.22; 100 $kBq.L^{-1}$: 1.01 ± 0.14) (**fig. 3A**). ICAM-1 expression is not modified whatever the ^{137}Cs concentration (**fig. 3B**). Concerning TNF-α and IFN-γ expression, we noticed a significant modifications at 20 and 100 $kBq.L^{-1}$ compared to non-exposed animals (for TNF-α : 0 $kBq.L^{-1}$: 1.00 ± 0.15; 4 $kBq.L^{-1}$: 0.60 ± 0.16; 20 $kBq.L^{-1}$: 0.36 ± 0.09; 100 $kBq.L^{-1}$: 0.46 ± 0.08 and for IFN-γ: 0 $kBq.L^{-1}$: 1.00 ± 0.15; 4 $kBq.L^{-1}$: 1.43 ± 0.40; 20 $kBq.L^{-1}$: 1.88 ± 0.33; 100 $kBq.L^{-1}$: 2.53 ± 0.54) (**fig. 3C and 3D**).



<u>Figure 3</u>: MCP-1, ICAM-1, TNF-α and IFN-γ and expression after 3 months internal chronic ^{137}Cs exposure

Expression of MCP-1 (A), ICAM-1 (B), TNF-α (C) and IFN-γ (D) was evaluated in aorta after 3 months of ^{137}Cs exposure by RT-qPCR. MCP-1 mRNA is significantly increased at 4 kBq.L^{-1} compared to non-exposed group (A). ICAM-1 mRNA expression is not modified whatsoever ^{137}Cs concentration (B). TNF-α expression is significantly decresed at 20 and 100 kBq.L^{-1}(C). For IFN-γ, expression increased significantly with ^{137}Cs concentration, especially at 20 and 100 kBq.L^{-1} after 3 months chronic internal exposure (D). Results are expressed as mean ± SEM comparing to non-exposed animal. *: $p<0,05$.

3 months low doses exposure increases VCAM-1 expression

VCAM-1 expression in aorta was measured by RT-qPCR, in plasma by ELISA, and by IHC on aorta cryosections. Results showed a significant increase in VCAM-1 expression at low doses radiation of 4, 20 and 100 kBq.L^{-1} as compared with non-exposed animals (0 kBq.L^{-1}: 1.00 ± 0.03; 4 kBq.L^{-1}: 4.45 ± 0.68; 20 kBq.L^{-1}: 3.26 ± 0.77; 100 kBq.L^{-1}: 3.45 ± 0.71) (**fig. 4A**). This result is confirmed with VCAM-1 plasmatic level and aortic endothelial expression, which were also increased at 100 kBq.L^{-1} as compared with non-exposed animals (0 kBq.L^{-1}: 370.99 ± 35.4 ng/ml; 4 kBq.L^{-1}: 326.47 ± 60.7 ng/ml; 20 kBq.L^{-1}: 262.56 ± 69.3 ng/ml; 100 kBq.L^{-1}: 426.18 ± 32 ng/ml) (**fig. 4B and 4C**).

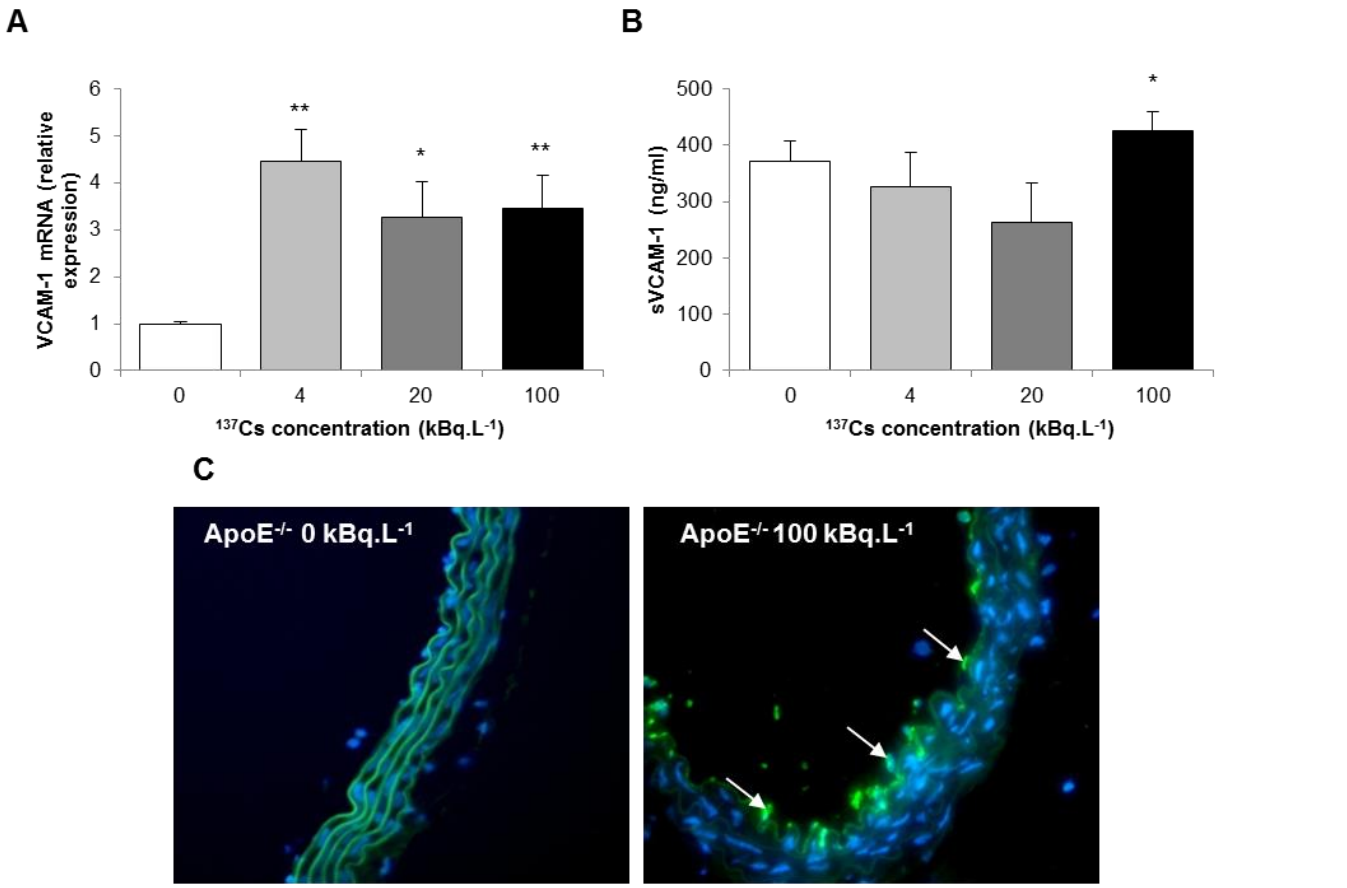


Figure 4: **VCAM-1 expression is increased after 3 months internal chronic ^{137}Cs exposure at 100 kBq.L^{-1}**
Evaluation of VCAM-1 gene expression in aorta by RT-qPCR show a significant increase at 4, 20 and 100 kBq.L^{-1} compared to non-exposed group (A). Measurement of plasmatic VCAM-1 by ELISA indicates a significant increase for ApoE$^{-/-}$ exposed with 100 kBq.L^{-1} compared to non-exposed group (B). Results are expressed as mean ± SEM comparing to non-exposed animal. *: p<0,05 ; **: p <0,01.
VCAM-1 was assessed by immunocytochemistry in aorta cryosections (frozen in OCT, 7 µm) (C). The results shows an increase in VCAM-1 (white arrows) on the endothelium surface for ApoE$^{-/-}$ animals contaminated with 100 kBq.L^{-1} (Magnification x100).

3 months low doses exposure increases arterial remodelling

To evaluate if the increase in VCAM-1 and IFN-γ correlate with modifications in the aorta structure, we measured aortic thickness on slides stained with Hemalun. We observed a significant increase in intimal-medial thickness for ApoE$^{-/-}$ animals exposed to 100 kBq.L^{-1} during 3 months (0 kBq.L^{-1}: 66.22 ± 3.9 µm; 4 kBq.L^{-1}: 68.22 ± 2.9 µm; 20 kBq.L^{-1}: 68.2 ± 4.15 µm; 100 kBq.L^{-1}: 108 ± 6 µm) (**fig. 5A and 5B**). We also assessed col3a1 and col1a2 mRNA expression in the aorta, and found a significant increase in that group compared to the non-exposed group (for col3a1: 0 kBq.L^{-1}: 1.00 ± 0.28; 4 kBq.L^{-1}: 1.2 ± 0.24; 20 kBq.L^{-1}: 4.72 ± 1.82; 100 kBq.L^{-1}: 4.5 ± 0.51. For col1a2: 0 kBq.L^{-1}: 1.00 ± 0.48; 4 kBq.L^{-1}: 3.72 ± 1.15; 20 kBq.L^{-1}:6.67 ± 0.52; 100 kBq.L^{-1}: 6.86 ± 2.3) (**fig. 5C and 5D**).

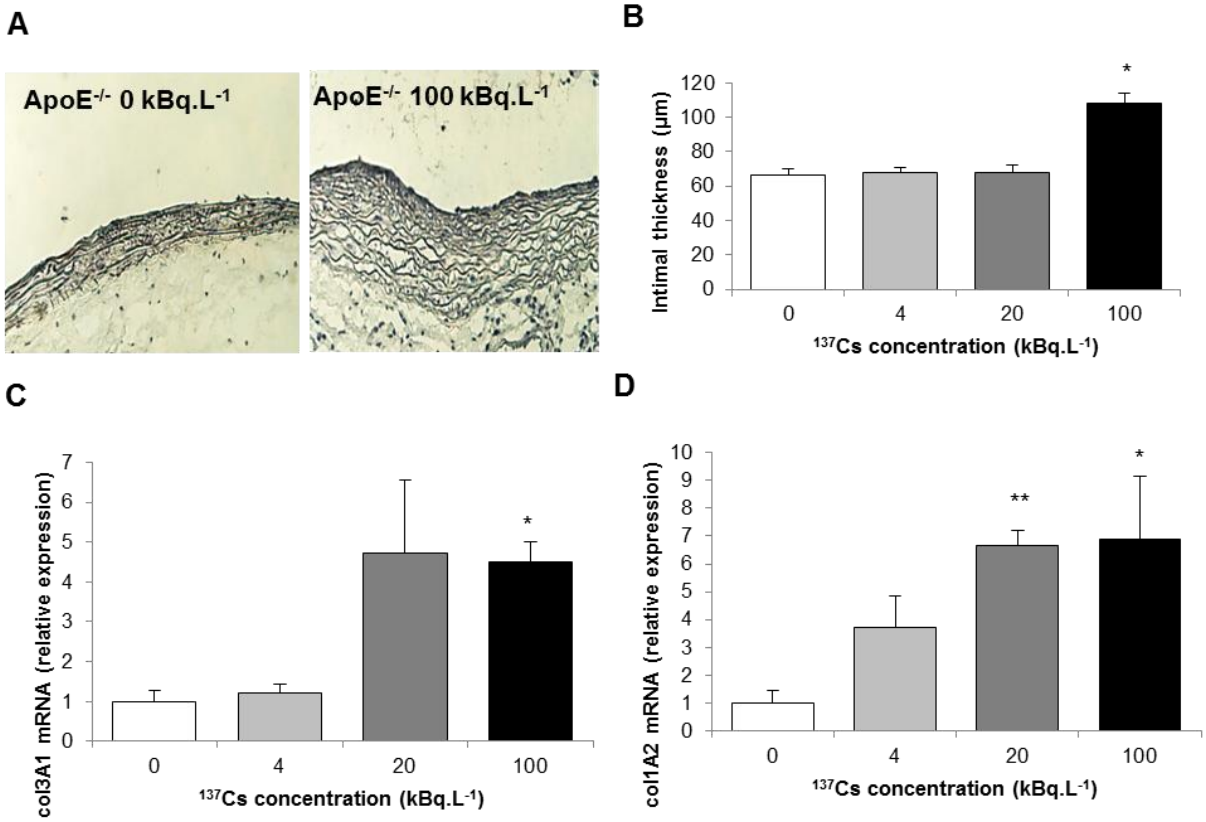


Figure 5: Vascular remodelling in ApoE$^{-/-}$ after 3 months chronic internal exposure and collagen aorta expression

Classic hemalun staining was made to evaluate aortic thickness (representative pictures, magnification x100) (A) and aortic wall thickness was measured (B). The aortic wall is significantly thicker in ApoE$^{-/-}$ animals contaminated with 100 kBq.L^{-1} as compared to non-contaminated animals. Evaluation of the intimal thickness was made with a specific software for histological analysis (Histolab).

Collagen3 (col3A1) and 1 (col1A2) aorta mRNA expression were assed by RT-qPCR. We observed a significant increase for both collagen type at 100 kBq.L^{-1} compare to non-exposed animal after 3 months internal ^{137}Cs exposure. Results are mean ± SEM. *: p<0,05 ; **: p<0,01.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study investigating the effects of a chronic internal exposure to low doses radiation with ^{137}Cs on very early atherosclerosis stages in which we assessed different parameters involved in atherosclerosis initiation. Previous results underlined that a chronic exposure to low doses of ^{137}Cs, comparable to those which were found in contaminated area such as Chernobyl, could induce cardiovascular system impairment in experimental models **(21)**. Our results demonstrate that chronic internal low doses exposure with ^{137}Cs influences specific pro-inflammatory processes associated with vascular remodelling.

A study reported an elevation of plasma cholesterol levels in people exposed to external high dose radiation during Chernobyl nuclear accident **(28)**. In our work, a chronic internal low dose exposure to ^{137}Cs did not affect weight gain in our experimental model. Plasma concentrations of cholesterol, HDL and LDL were similar between non-exposed and ^{137}Cs-exposed animals. This result is in accordance with previous work for radiation dose up to 0.5 Gy in $ApoE^{-/-}$ mice, measured after 3 months exposure **(16)**. In a recent study, *Shoa et al.* investigate the effects of a multiple low-dose radiation (LDR) in a diabetic mouse model (type 2). Mice were exposed at different external irradiation doses of X-rays (25, 50 or 75 mGy) during 4 or 8 weeks, and results showed that multiple exposures to LDR have a beneficial effects on lipid profiles, lowering plasma triglycerides, cholesterol, HDL and LDL **(29)**.

Oxidative stress and ROS production is a major pathway in atherosclerosis **(30-31)**. It is well documented that radiation induces an increase in ROS generation *in vivo* as well as *in vitro* for high doses but also for low dose exposure **(32-33)**. Among enzymes generating ROS, NADPH oxidase is one of the sources of superoxide production in the vasculature, and its up-regulation is associated with atherosclerosis in coronary arteries **(34)**. Despite superoxide anions production revealed by DHE staining did not revealed any changes in ROS level within the aorta for either exposed or non-exposed animals, we focused on p47 and p67, two

NADPH oxidase subunits expression and showed a significant increase in its expression for the exposed-groups. On the other hand, aorta expression of two anti-oxidant enzymes, CAT and GPx did not seem to be affected following a 3 months low-dose exposure, even if for the highest concentration of 100 $kBq.L^{-1}$ we observe a tendency to increase in GPx mRNA expression ($p=0.058$). It suggests that redox balance is maintained, and may be not responsible for inflammatory increase and vascular remodelling observed at this time point of exposure.

Anti-inflammatory effect of low-dose or 0.5 Gy γ radiation have been reported in various animals models of autoimmune diseases **(35)**. In our study, expression of various inflammatory cytokines involved in atherosclerosis progression shows a decrease in TNF-α expression mRNA expression for $ApoE^{-/-}$ exposed with 100 $kBq.L^{-1}$, when the absorbed radiation dose reaches 37.5 mGy. TNF-α production has been reported in a mouse macrophage cells irradiated with 0.5 Gy **(36)**. Authors proposed a mechanism to explain the anti-inflammatory effects action of a γ radiation comprise between 0.5 -1 Gy: radiation could induce the up-regulation of MKP-1 (MAPK phosphatase), resulting in dephosphorylation of p38 MAPK and suppression of pro-inflammatory cytokines production in a cell model of inflammatory response (RAW264.7) **(36)**.
However, in our work, we observed an increase in IFN-γ expression for $ApoE^{-/-}$ exposed with 100 $kBq.L^{-1}$. Several studies have shown that IFN-γ expression can be modulated after a low-dose irradiation, but the sense of variation depends of the model and the dose. For example an irradiation of a skin tissue model at 30 mGy increased significantly IFN-γ expression 48h after exposure **(37)**, whereas in a mice model of brain inflammation, a repeated exposure to 0.5 Gy of a γ irradiation induced a decrease in inflammatory cytokine levels **(38)**.

IFN-γ is an important inductor of expression of both VCAM-1 and ICAM-1 in endothelial cells and smooth muscle cells **(39).** Experimentally, irradiation can also influences adhesion molecules expression, involved in endothelial dysfunction (ED), which is another major process involved in atherosclerosis genesis and thus alter endothelial functions **(40-41)**. *Heckmann et al* reported that VCAM-1 expression in human dermal microvascular

endothelial (HDMEC) cells exposed to 5 or 10 Gy presented an up-regulation in VCAM-1 expression 24h after irradiation **(42)**. Other groups did not found this modulation in irradiated in HDMEC or HUVEC **(43-44)**.

The functional elevation of IFN-γ/VCAM-1 expression in radiation-induced leukocyte recruitment needs to be clarified. VCAM-1, expressed by endothelial cells, play a pivotal role in initiation of atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice, promoting monocyte adhesion and entry into the subendothelial space in early atherogenesis **(45)**. We here showed that VCAM-1 expression is significantly increased after a 3 months low dose radiation exposure in our predisposed animals. We can hypothesis that this observed increase could be linked to IFN-γ expression modulation. Indeed, one of the earliest events in the development of the fatty streak is the induced expression of adhesion molecules including vascular cell adhesion molecule VCAM-1 and ICAM-1 **(46)**.

In order to evaluate if this elevation of IFN-γ/VCAM-1 could have an impact on aorta structure, we evaluated intima-media thickness, a classical parameter of arterial remodelling **(47)**. 3 months after the beginning of exposure, atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice fed with a normal chow diet is considered to be at an early stage of development **(48)**. At this point, existing lesions had not yet progressed. Vascular remodelling can occur as an adaptive response to various stimuli **(49)**. Extracellular matrix (ECM) within the vascular network plays both structural and regulatory role. The ECM is a dynamic composite of multiple proteins that form structures connecting cells within the network. Blood vessels are distended by blood pressure or other stimuli and therefore require ECM components with elasticity with enough tensile strength to resist rupture. Collagen production and degradation, a major ECM component, play a crucial role in this phenomenon **(50)**. IFN-γ also increases the expression of integrins such as α-5-β-1 integrin on the surface of vascular smooth muscle cells **(51)**. This allows the cells to bind to the fibronectin component of the ECM providing a substrate for SMC migration to the lesion and thereby, causing the cells to adopt a proliferative phenotype. We here observed a significant increase in aorta intima-media thickness for the group exposed to the highest concentration, in correlation with a significant increase in col3a1 and col1a2 mRNA expression in this group. The expression of a number of collagen

genes (collagen 1 and collagen 3) as well as SMC proliferation and matrix synthesis is increased by IFN-γ **(52)**. We can hypothesize that this increased may be due to an increase in both IFN-γ/VCAM-1 leading to a stimulation of collagen synthesis within the arterial wall inducing this aorta remodelling, in response to a chronic low-dose exposure.

Taken together, these results in our experimental model predisposed to atherosclerosis, suggest that a sub-chronic internal low-dose ^{137}Cs induce an early endothelium response, without no real dose-response in the observed effects.

Now, it would be of interest to evaluate in greater detail atherosclerotic plaque formation in different conditions, including different animal models or mode (internal or external irradiation)/time (chronic or acute) of exposure, to determine if exposure to ^{137}Cs would influence plaque growth and stability in more advanced stages of atherosclerosis, and if the early vascular remodelling observed in our study is transitory or have consequences on disease development and progression.

Acknowledgements

Dr Stéphanie Lehoux is the recipient of a Canada Research Chair and is supported by the Canadian Foundation for innovation and the Canadian institutes of health research. This work was supported by grants from Electricité de France (EDF).

The authors wish to thanks V. Joffres and D. Lurmin for secretarial assistance and F. Voyer, T. Loiseau and JM Guischet for expert animal care.

References

1. Pacurari, M., et al., *The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling.* Int J Inflam, 2014. **2014**: p. 689360.

2. Jin, H.Y., et al., *ACE2 deficiency enhances angiotensin II-mediated aortic profilin-1 expression, inflammation and peroxynitrite production.* PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38502.

3. Patel, V.B., et al., *Loss of angiotensin-converting enzyme-2 exacerbates diabetic cardiovascular complications and leads to systolic and vascular dysfunction: a critical role of the angiotensin II/AT1 receptor axis.* Circ Res, 2012. **110**(10): p. 1322-35.

4. Heeneman, S., J.C. Sluimer, and M.J. Daemen, *Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling.* Circ Res, 2007. **101**(5): p. 441-54.

5. Griendling, K.K., et al., *Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(10): p. 2175-83.

6. Higuchi, S., et al., *Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology.* Clin Sci (Lond), 2007. **112**(8): p. 417-28.

7. Schiffrin, E.L., *Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment.* Hypertension, 2012. **59**(2): p. 367-74.

8. Patel, V.B., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 is a critical determinant of angiotensin II-induced loss of vascular smooth muscle cells and adverse vascular remodeling.* Hypertension, 2014. **64**(1): p. 157-64.

9. Adams, M.J., et al., *Cardiovascular status in long-term survivors of Hodgkin's disease treated with chest radiotherapy.* J Clin Oncol, 2004. **22**(15): p. 3139-48.

10. Darby, S., et al., *Mortality from cardiovascular disease more than 10 years after radiotherapy for breast cancer: nationwide cohort study of 90 000 Swedish women.* BMJ, 2003. **326**(7383): p. 256-7.

11. Carr, Z.A., et al., *Coronary heart disease after radiotherapy for peptic ulcer disease.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **61**(3): p. 842-50.

12. Yamada, Y., et al., *Quantitative evaluation of changes in irradiated lung fields after stereotactic irradiation by the Polygon Method.* Radiat Med, 2004. **22**(2): p. 98-105.

13. Wong, F.L., et al., *Effects of radiation on the longitudinal trends of total serum cholesterol levels in the atomic bomb survivors.* Radiat Res, 1999. **151**(6): p. 736-46.

14. Hoving, S., et al., *Single-dose and fractionated irradiation promote initiation and progression of atherosclerosis and induce an inflammatory plaque phenotype in ApoE(-/-) mice.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **71**(3): p. 848-57.

15. Schultz-Hector, S. and K.R. Trott, *Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data?* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **67**(1): p. 10-8.

16. Mitchel, R.E., et al., *Low-dose radiation exposure and atherosclerosis in ApoE(-)/(-) mice.* Radiat Res, 2011. **175**(5): p. 665-76.

17. IAEA, *Environmental consequences of Chernobyl accident and their remediation: Twenty years of experience.* Report of the Chernobyl Forum Expert Group "Environment" (Vienna: IAEA), 2006.

18. Takatsuji, T., et al., *Relationship between the 137Cs whole-body counting results and soil and food contamination in farms near Chernobyl.* Health Phys, 2000. **78**(1): p. 86-9.

19. ICRP, *Dose coefficients for intakes of radionuclides by workers* report of a task group of committee 2 of the international commission on radionuclides by workers and task group of committee 2 of the international commission on radiological protection, 1994. **ICRP24**: p. 1-83.

20. Leggett, R.W., et al., *A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body.* Sci Total Environ, 2003. **317**(1-3): p. 235-55.

21. Gueguen, Y., et al., *Chronic contamination of rats with 137 cesium radionuclide: impact on the cardiovascular system.* Cardiovasc Toxicol, 2008. **8**(1): p. 33-40.

22. Joven, J., et al., *The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain.* Atherosclerosis, 2007. **195**(2): p. e85-92.

23. Bertho, J.M., et al., *Biodistribution of (137)Cs in a mouse model of chronic contamination by ingestion and effects on the hematopoietic system.* Radiat Environ Biophys, 2010. **49**(2): p. 239-48.

24. Handl, J., et al., *Evaluation of radioactive exposure from 137Cs in contaminated areas of Northern Ukraine.* Health Phys, 2003. **84**(4): p. 502-17.

25. ICRP, *The concept and use of reference animals and plants.* Publication 108 Environmental protection, 2008. **Ann ICRP38**(Pergamon press (oxford)): p. 1-242

26. Bertho, J.M., *Absorbed radiation doses due to chronic ingestion of cesium-137 or Strontium-90 by mice. .* Radioprotection, 2012. **47**: p. 219-230.

27. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

28. Chaialo, P.P., et al., *[Content of blood lipids and characteristics of dyslipoproteinemias in people exposed to radiation during the accident at the Chernobyl nuclear power station].* Ukr Biokhim Zh, 1991. **63**(6): p. 93-6.

29. Shao, M., et al., *Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress.* PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92574.

30. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis.* Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.

31. Harrison, D., et al., *Role of oxidative stress in atherosclerosis.* Am J Cardiol, 2003. **91**(3A): p. 7A-11A.

32. Lyng, F.M., C.B. Seymour, and C. Mothersill, *Oxidative stress in cells exposed to low levels of ionizing radiation.* Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 2): p. 350-3.

33. Riley, P.A., *Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation.* Int J Radiat Biol, 1994. **65**(1): p. 27-33.

34. Guzik, T.J., et al., *Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(2): p. 333-9.

35. Tanaka, T., et al., *Repeated 0.5-Gy gamma-ray irradiation attenuates autoimmune manifestations in MRL-lpr/lpr mice.* Int J Radiat Biol, 2005. **81**(10): p. 731-40.

36. Tsukimoto, M., et al., *0.5 Gy gamma radiation suppresses production of TNF-alpha through up-regulation of MKP-1 in mouse macrophage RAW264.7 cells.* Radiat Res, 2009. **171**(2): p. 219-24.

37. Varnum, S.M., et al., *The effects of low-dose irradiation on inflammatory response proteins in a 3D reconstituted human skin tissue model.* Radiat Res, 2012. **178**(6): p. 591-9.

38. Tsukimoto, M., et al., *Repeated 0.5-Gy gamma irradiation attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis with up-regulation of regulatory T cells and suppression of IL17 production.* Radiat Res, 2008. **170**(4): p. 429-36.

39. Li, H., et al., *Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma.* Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1551-9.

40. Menendez, J.C., et al., *Effects of radiation on endothelial function.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **41**(4): p. 905-13.

41. Soucy, K.G., et al., *Single exposure gamma-irradiation amplifies xanthine oxidase activity and induces endothelial dysfunction in rat aorta.* Radiat Environ Biophys, 2007. **46**(2): p. 179-86.

42. Heckmann, M., et al., *Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation.* Exp Cell Res, 1998. **238**(1): p. 148-54.

43. Hallahan, D., J. Kuchibhotla, and C. Wyble, *Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium.* Cancer Res, 1996. **56**(22): p. 5150-5.

44. Quarmby, S., R.D. Hunter, and S. Kumar, *Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells.* Anticancer Res, 2000. **20**(5B): p. 3375-81.

45. Dansky, H.M., et al., *Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(10): p. 1662-7.

46. Aslanian, A.M., H.A. Chapman, and I.F. Charo, *Transient role for CD1d-restricted natural killer T cells in the formation of atherosclerotic lesions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(3): p. 628-32.

47. de Groot, E., et al., *Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis.* Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2008. **5**(5): p. 280-8.

48. Nakashima, Y., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree.* Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 133-40.

49. Secomb, T.W., M.W. Dewhirst, and A.R. Pries, *Structural adaptation of normal and tumour vascular networks.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012. **110**(1): p. 63-9.

50. Wagenseil, J.E. and R.P. Mecham, *Vascular extracellular matrix and arterial mechanics.* Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 957-89.

51. Barillari, G., et al., *Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cells locomotion and growth by enhancing alpha5beta1 integrin expression and function.* Atherosclerosis, 2001. **154**(2): p. 377-85.

52. Amento, E.P., et al., *Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb, 1991. **11**(5): p. 1223-30.

II – Effets d'une exposition chronique au cesium 137 *in vivo* – moyen/long terme dans un modele d'athérosclerose murin ApoE$^{-/-}$

Les résultats obtenus au temps d'exposition de 3 mois soulèvent de nombreuses interrogations, notamment celles de savoir si le phénomène de remodelage vasculaire, l'épaississement aortique chez les souris ayant reçues la plus forte concentration va se maintenir au cours du temps.

Ainsi, les durées d'exposition au césium 137 sont de 6 et 9 mois, afin d'atteindre des stades plus avancés de la pathologie athéromateuse. Nous avons étudié le profil inflammatoire, la balance pro/anti oxydante, ainsi que le phénotype des plaques formées au niveau du sinus aortique.

Nos résultats montrent que le profil inflammatoire tend vers une baisse des marqueurs, s'accompagnant d'une augmentation du collagène intra-plaque, suggérant une meilleure stabilité des plaques chez les animaux exposés à la concentration maximale de 100 kBq.L^{-1}.

Les résultats de cette seconde étude ont fait l'objet d'une soumission dans la revue « Plos One ».

En annexe : version en ligne de cet article, accepté en juin 2015.

Chronic internal exposure to low dose ^{137}Cs induces positive impact on the stability of atherosclerotic plaques by reducing inflammation in ApoE$^{-/-}$ mice

[1]**C. Le Gallic**, [1]Y. Phalente, [1]L. Manens, [1]I. Dublineau, [1]M.Benderitter, [1]Y.Gueguen, [2]S. Lehoux*, [1]T.G. Ebrahimian*

1. IRSN. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de RadioToxicologie Experimentale, 92262, Fontenay-aux-Roses, France.

2. Lady Davis Institute, McGill University, Montreal, Canada

* these authors share senior authorship

Running title: **Chronic low dose exposure to ^{137}Cs enhances atherosclerosis plaques stability**

Corresponding author:
Dr. Teni Ebrahimian
Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de RadioToxicologie Expérimentale
92262, Fontenay-aux-Roses, France
Phone: +33(1) 58 35 70 07
Fax: +33(1) 58 35 84 67
E-mail : teni.ebrahimian@irsn.fr

Abreviations

^{137}Cs: Caesium 137

αSMA: α smooth muscle actin

ApoE: Apolipoprotein E

Bq: Becquerel

CAT: Catalase

CRP: C Reactive Protein

Col3a1: Collagen, type III alpha 1

CVD: Cardiovascular disease

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DHE: Dihydroethidium

E-Sel: E-Selectin

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GPx: Gluthathione peroxydase

Gy: Gray

HDL: High density lipoprotein

HO-1: heme-oxygenase 1

HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1

IFNγ: Interferon γ

LDL: Low density lipoprotein

MCP1: Monocyte chemoattractant protein 1

MMP2: Matrix metalloproteinase 2, gelatinase A

MMP8: Matrix metalloproteinase 8, neutrophil collagenase

MMP13: Matrix metalloproteinase 13, collagenase 3

Nrf2: Nuclear factor-like 2

ROS: Reactive Oxygen Species

TNFα: Tumor Necrosis Factor α

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

VSMC: Vascular Smooth muscle cells

Abstract

After Chernobyl and Fukushima Daï Chi, two major nuclear accidents, large amounts of radionuclides were released in the environment, mostly caesium 137 (^{137}Cs). Populations living in contaminated territories are chronically exposed to radionuclides by ingestion of contaminated food. However, questions still remain regarding the effects of low dose ionizing radiation exposure on the development and progression of cardiovascular diseases. We therefore investigated the effects of a chronic internal exposure to ^{137}Cs on atherosclerosis in predisposed ApoE$^{-/-}$ mice. Mice were exposed daily to 0, 4, 20 or 100 kBq.L^{-1} ^{137}Cs in drinking water, corresponding to range of concentrations found in contaminated territories, for 6 or 9 months. We evaluated plaque size and phenotype, inflammatory profile, and oxidative stress status in different experimental groups. Results did not show any differences in atherosclerosis progression between mice exposed to ^{137}Cs and unexposed controls. However, ^{137}Cs exposed mice developed more stable plaques with decreased macrophage content, associated with reduced aortic expression of pro-inflammatory factors (CRP, TNFα, MCP-1, IFNγ) and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin). Lesions of mice exposed to ^{137}Cs were also characterized by enhanced collagen and smooth muscle cell content, concurrent with reduced matrix metalloproteinase MMP8 and MMP13 expression.

These results suggest that low dose chronic exposure of ^{137}Cs in ApoE$^{-/-}$ mice enhances atherosclerotic lesion stability by inhibiting pro-inflammatory cytokine and MMP production, resulting in collagen-rich plaques with greater smooth muscle cell and less macrophage content.

Key words: Caesium 137, atherosclerosis, ApoE$^{-/-}$ mice, inflammation, plaque stability

Introduction

Exposure to high doses of ionizing radiations increases the risk for cardiovascular diseases (CVD) due to damages to the heart structure and vessels **(1-3)**. Moreover, an association between CVD and radiotherapy has been reported in patients treated for Hodgkin's disease **(4)** and breast cancer **(5)**. Studies of atomic bomb survivors in Japan who received a single dose to the whole body of 0 to 4 Gy, showed that CVD risk was dose-related, and increased by 14% per Gy **(6)**.

However, it is unclear from human studies whether an association exists between cardiovascular disease and low dose radiation exposure **(7-8)**. The main interrogations include if and how low doses elevate the risk of cardiovascular disease, as reported by some epidemiological studies, and whether the mechanisms implicated differ from high-dose effects **(9)**. These questions are particularly pertinent in the setting where the re-population of contaminated territories is envisioned after a nuclear accident.

After the accidents at Chernobyl (1986) and Fukushima (2011), large amount of caesium 137 (^{137}Cs) were released in the environment **(10)**. ^{137}Cs is the main fission product of uranium and plutonium within nuclear reactors. It is a radionuclide which bears a low chemotoxicity but high radiotoxicity, mainly related to emission of β and γ rays **(11)**. Because ^{137}Cs has a 30 year half-life, it remains one of the major sources of exposure for the population in contaminated territories **(12)**. Several studies have reported that the youngest children in the contaminated areas exposed to the Chernobyl accident are developing thyroid cancer, bone disorders **(13)**, as well as nervous and digestive system disorders **(14)**. The cardiovascular system may also be targeted. Liquidators who took part in the repair at Chernobyl are reported to have loss of vascular tone, amplified venous return, and increased myocardial contractility **(15)**. High levels of ^{137}Cs have been observed in the hearts of adults and children living in the contaminated areas of Belarus, and they may be related to a wide variety of changes to this organ, including cardiovascular symptoms, electrocardiography alterations, and hypertension **(16)**, although the elevated blood pressure may be related to

not only to the ^{137}Cs but also perhaps to the psychological stress provoked by the accident **(17)**.

A previous experimental study in rats showed that chronic exposure to low doses of ^{137}Cs decreases mean arterial blood pressure and increases the expression of angiotensin and brain natriuretic peptide in the atria, without any changes in heart histology **(18)**. However, the consequences of a chronic ingestion of low quantities of ^{137}Cs over a long period of time, on atherosclerosis progression are still unknown.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory pathology of large and medium arteries. It is a leading cause of mortality in western countries **(19)**. In the course of the atherogenic process, oxidized low-density lipoproteins enter the vascular wall and induce an inflammatory reaction. As a result, endothelial cells express adhesion molecules such as E-selectin (E-Sel), intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) that are necessary for the adhesion and diapedesis of monocytes. Concurrently, a number of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNFα), interferon gamma (IFN-γ), and monocyte chemo attractant protein-1 (MCP-1) are released, contributing to monocyte chemotaxis. All of these factors contribute to plaque progression **(20)**. Monocytes within the lesion differentiate into macrophages which incorporate the oxidized low-density lipoproteins and become foam cells. These lipid-laden cells have low structural strength and contribute to plaque fragility. On the contrary, vascular smooth muscle cells (VSMC) are the main components of atherosclerotic plaques responsible for promoting plaque stability; they produce collagen and other extracellular matrix proteins that constitute the fibrous cap **(21)**, which protects lesions from rupture **(22)**. It is well documented that vulnerable plaques have high expression of some metalloproteinases (MMP 2, 3, 8 and 13) that degrade matrix components and are responsible for plaque destabilization and rupture **(23)**. The production of these MMPs by VSMCs and macrophages is regulated by inflammation **(19)**. Thus, most clinical manifestations of atherosclerosis, which are due to plaque rupture, depend on the change in balance between VSMCs and collagen buildup on the one hand, and foam cell accumulation and fibrous cap degradation by MMPs on the other hand. Inflammation is the primary underlying cause of atherosclerotic

plaque instability and rupture **(19)**, and C-reactive protein (CRP), a marker of inflammation, has become the prototypic risk marker for CVD **(24)**.

The objective of the present study was to investigate the effect of chronic low dose internal exposure to ^{137}Cs on atherosclerosis development and progression in genetically predisposed ApoE$^{-/-}$ mice **(25—26)**. Animals were chronically exposed to 20, 100 or 500 Bq/animal of ^{137}Cs administrated through drinking water. Our dosing range (4-100 kBq.L^{-1}) corresponds to a range spanning 5 times less and 5 times more than the concentration of 20 kBq.L^{-1} used in previous studies **(27)**. More importantly, our ingestion rates are close to the estimated ingestion rates of 20 to 2100 Bq.day^{-1} that were calculated to be ingested by humans living in contaminated areas **(28)**. As a whole, ^{137}Cs contamination of human tissues was previously found to be in the range of 100 and 2000 Bq.kg^{-1}, measured in the whole body **(29)**, in urine samples **(30)** or in organs at autopsy **(31-32)**. We investigated atherosclerosis progression along with oxidative stress balance, inflammatory status and indices of plaque stability at different stages of the pathology.

Material and methods

Animals

7-8 week-old ApoE$^{-/-}$ male mice were obtained from Charles River Laboratory. Each group was comprised of 10 animals. ApoE$^{-/-}$ mice are homozygous null for a functional ApoE gene on a C57BL/6J background. Apolipoprotein E acts as the main ligand mediating removal of cholesterol enriched chylomicron and VLDL remnants from the blood stream and plays an important role in lipoprotein metabolism. These mice develop atherosclerosis when fed with a normal low fat diet. The morphological features of early-stage lesions in ApoE$^{-/-}$ mice are very similar to those found in humans **(33)**. Animals were maintained in a specific-pathogen-free environment and monitored daily. All experiments and procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as published by the French regulations for animal experiments (Ministry of Agriculture Order No. B92-032-01, 2006) with European Directives (86/609/CEE), and approved by the local ethical committee of the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (Permit Number: P10-11 and thematic number: T29).

Cs 137 exposure

Animals were separated into 4 groups : ApoE$^{-/-}$ mice receiving either tap water *ad libitum* or tap water *ad libitum* supplemented with 4, 20 or 100 kBq.L^{-1} of ^{137}Cs (^{137}CsCl final concentration 5x10^{-9}M, CERCA-LEA, Pierrelatte, France), during 6 or 9 months.

Blood sampling and analysis

Mice were terminally anesthetized by intraperitoneal injection of ketamin/xylazin (Ketamine 500 Virbac France, Rompun 2% Bayer). Blood was collected by intracardiac puncture with a heparinised syringe. Blood was centrifuged for 8 minutes at 800 *g* and plasma was harvested and frozen for subsequent analysis. Plasma cholesterol, low and high density lipoproteins

(LDL and HDL) levels were determined with an automated spectrophotometric system (Konelab 20, Biological Chemistry Reagents, Thermo Electro Corporation, France).

Tissue collection

Hearts (including the aortic root) were separated from the aorta, embedded in Optimum Cutting Temperature medium (OCT, Sakura, Fineteck Europe), and snap-frozen on a metal plate that was cooled with liquid nitrogen. Aortas were excised from the aortic arch to the femoral bifurcation and directly snap frozen on liquid nitrogen. The thoracic and abdominal aortas were separated for gene and protein expression analysis.

^{137}Cs measurement

Gamma spectrometry with a gamma counter (Packard Cobra Model II D5003) was used to measure ^{137}Cs. The gastrocnemus muscle was counted for 60 minutes, and the count was related to its weight. The detection limit ranged from 4.2 to 12 counts per minute per sample, depending on the mass of the organ tested and the duration of the counting period. The radiation dose received by the muscle was calculated according to models developed for rodents **(34)**, as previously described **(35)**.

Gene expression

Total RNA from thoracic aortas was extracted. Briefly, aortas, are grinded with a Precellys®24 (Bertin Technologies, France) using TRI Reagent solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). After extraction, we performed a purification of RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen). RNA quality was checked by measuring the ratio of optical densities at 260 and 280 nm. Real-time qPCR (RT-qPCR) was used to analyse the mRNA levels of inflammatory cytokines and adhesion molecules (CRP, TNFα, MCP-1, IFNγ, ICAM-1, VCAM-1, and ESel). Oxidative stress balance was evaluated by mRNA expression of pro and anti-oxidant

enzymes (CAT, HO-1, Nrf2 and GPx). Finally, the mRNA expression of collagen (col3a1) and MMP13 was evaluated. Real-time qPCR was performed with an Abi Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using SYBR Green (Applied Biosystems). All samples were normalized to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to analyse the results **(36)**.

All RT-qPCR results are expressed as mean ± SEM, and compared to expression levels of non-exposed group, which is set at 1. Primers were designed using Primer-BLAST software (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Sequences of the forward and reverse primers used are listed in **Table 1**.

Gene	Gene bank accession	Strand	Sequence
Col3A1	NM_009930.2	Sens	5'- TCCCCTGGAATCTGTGAATC -3'
		Antisense	5'- TGAGTCGAATTGGGGAGAAT -3'
GAPDH	NM_001289726.1	Sens	5'- CCCCAGCAAGGACACTGAGCAAG -3'
		Antisense	5'- TGGGGGTCTGGGATGGAAATTGTGA -3'
GPx	NM_008160.6	Sens	5'- CTGTGAACTCTGTCCAATG -3'
		Antisense	5'- AACTGTGTCAGGTATCTCC -3'
HO-1	NM_010442.2	Sens	5'- GGGACTACACCGAGATGAACG -3'
		Antisense	5'- TCCGCAGGAAGGTAAAGAGC -3'
HPRT	NM_013556.2	Sens	5'- TCAGTCAACGGGGGACATAAA - 3'
		Antisense	5'- GGGGCTGTACTGCTTAACCAG - 3'
ICAM1	NM_010493.2	Sens	5'- TTCTCATGCCGCACAGAACT -3'
		Antisense	5'- TCCTGGCCTCGGAGACATTA -3'
IFNγ	NM_008337.3	Sens	5'- TCTGGGCTTCTCCTCCTGCGG -3'
		Antisense	5'- GGCGCTGGACCTGTGGGTTG -3'
MCP1	NM_011333.3	Sens	5' GCACCAGCACCAGCCAACTCT -3'
		Antisense	5'- TGGATGCTCCAGCCGGCAACT -3'
MMP13	NM_008607.2	Sens	5'- ACAGGCTCCGAGAAATGCAA -3'
		Antisense	5'- CCACATCAGGCACTCCACAT -3'
Nrf2	NM_010902.3	Sens	5'- CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA -3'
		Antisense	5'- GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT -3'
SELE	NM_011345.2	Sens	5'- ATGCAGCGCACAAGGGCAGT -3'
		Antisense	5'- CCCGTGGCACCACACGTCAG -3'
TNFα	NM_013693.1	Sens	5'- GACAAGGCTGCCCCGACTA -3'
		Antisense	5'- AGGGCTCTTGATGGCAGAGA -3'
VCAM1	NM_011693.3	Sens	5'- AAGCCGGTCACGGTCAAGT -3'
		Antisense	5'- GGTCACCCTTGAACAGATCAATC -3'

Table 1. Primers sequences used for RT-qPCR. Primers sequences were obtained using Primer-BLAST.

Aortic protein expression and activity

Total aorta proteins were extracted according the manufacturer's instructions (Total protein extraction kit, Millipore), and protein quantity was measured by a classic Bradford assay. To assess cytokine expression in aorta, we perform a multiplex analysis on protein extracts according the manufacturer's instructions (MMMP1MAG-79K, Merck Millipore). We assessed the protein expression of MMPs implicated in atheromatous plaque destabilization (MMP-2, MMP-3 and MMP-8), and set non-^{137}Cs-exposed mouse tissue MMP levels at 1. GPx activity was measured in aortic protein extracts according the manufacturer's instructions (Glutathione Peroxidase Assay Kit, Cayman Chemical). GPx activity in tissues from non-exposed mice was set at 100%. To assess MMP activity, aortic sinus cryosections were incubated at 37°C for 24 hours with fluorogenic gelatine substrate (DQ gelatine, E12055 Molecular Probes, Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) in a dark humid chamber. The mixture was prepared following manufacturer's instructions. Slides were rinsed in PBS and mounted with Vectashield with DAPI (Vectorlabs). The gelatinolytic activity was observed as green fluorescence (absorption maxima, 495 nm; fluorescence emission maxima, 515 nm) by fluorescence microscopy (Axiophot, Zeiss, Germany). Negative control sections were incubated as described above, but without DQ-gelatine.

Histological and immunohistochemical analyses of aortic plaque phenotype

Cryosections of 7 µm thickness were cut from the origin of the aortic root throughout the aortic sinus, for histological and immunohistochemical analysis.

Oil red O and picrosirius red staining

Five to seven sections per animal were stained for the oil red O (Sigma-Aldrich) to evaluate the lipid content. Mean lesion area was calculated using Histolab software (GT Vision LTD, UK) as described previously **(37-38)**. Lesion area of control, unexposed mice was set as 100% relative to the total aortic sinus area. Five to seven sections per animal were stained to evaluate plaque collagen content, a standard Picrosirius red staining (Sigma-Aldrich).

Quantification of the red stain area of control, unexposed mice was set as 100% relative to the total plaque area. All images were acquired using an Axiophot (Zeiss, Germany).

Smooth muscle alpha-actin and macrophages immunostaining

VSMC and macrophage content were determined by immunofluorescence using monoclonal anti-α-smooth muscle cell actin (clone 1A4, Life Science A5691) and anti-CD68 (Abcam 1252), respectively. The aortic sinus cryosections were incubated then with primary antibody (1:100), rinsed, and further incubated with fluorescently labeled secondary antibodies (1:500) (Invitrogen). At least five sections per animal were stained. Images were acquired using an Axiophot (Zeiss, Germany) and analyzed using Histolab software (GT Vision LTD, UK). The presence of the immunofluorescent staining was quantified and expressed in percentage of the total lesion area. For negative control, sections were incubated with secondary antibody only. Nuclei were stained with DAPI (Vectorlabs). All values were normalized to values in non-exposed ApoE$^{-/-}$ animals, set at 100 %.

Superoxide staining

The evaluation of ROS production in the entire plaque area of the aortic sinus was performed by Dihydroethidium staining (DHE, 2 µM; Molecular Probes), applied during 30 minutes at 37°C. For negative control, sections were incubated with PBS 1X only. The slides were independently examined on a blinded basis for the level of ROS staining, using a 0- to 4- point intensity gradient.

Statistical Analysis

Experiments were made with 10 animals per group per experimental condition. One-way ANOVA and *Student's t-test* was used to compare exposed and non-exposed animals results. All results are expressed as means ± SEM. Statistical software Sigma Plot 11.0 (SPSS, France) was used for all statistical analysis. Results with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Chronic exposure to ^{137}Cs has no effect on animal general health parameters or plasma lipid levels

We found that ^{137}Cs activity increased proportionally to ^{137}Cs intake in the skeletal muscle of animals, where it accumulates preferentially *(**figure 1**).*

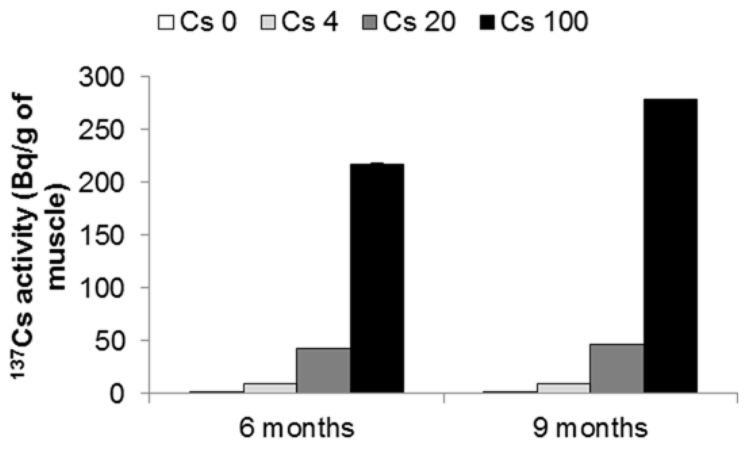


Figure 1. ^{137}Cs activity measurement correlates with ^{137}Cs absorption in the gastrocnemus muscle, validating our experimental model. Activity is expressed as mean ± SEM of n=8 per group per time.

The activity expressed in $Bq.g^{-1}$ of tissue in the skeletal muscle after 6 months exposure was 0.12 ± 0.09; 8.00 ± 0.11; 37.58 ± 0.20; 191.91 ± 0.50 for 0, 4 , 20 and 100 $kBq.L^{-1}$ respectively, and after 9 months exposure was 0.08 ± 0.08; 10.02 ± 0.15 ; 46.49 ± 0.49; 278.41 ± 1.00 for 0, 4 , 20 and 100 $kBq.L^{-1}$ respectively. The resulting absorbed radiation doses due to ^{137}Cs ingestion were calculated as previously described **(Bertho 2012)** and were 3, 15, and 75 mGy after 6 months and 6, 30, and 150 mGy after 9 months exposure to 4, 20 and 100 $kBq.L^{-1}$ of ^{137}Cs, respectively. Exposure to ^{137}Cs did not alter body weight in $ApoE^{-/-}$ mice at any time over the 9 months of treatment, compared with unexposed mice (**figure 2**).

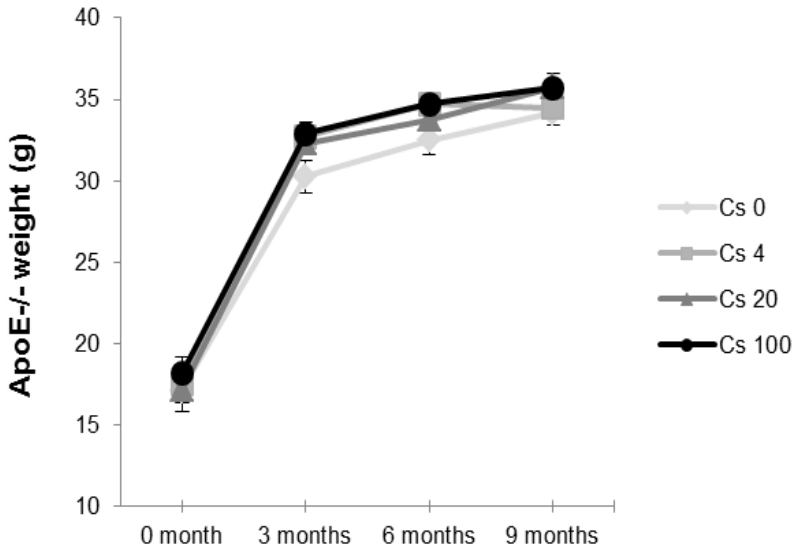


Figure 2. ^{137}Cs exposure does not interfere with weight gain in $ApoE^{-/-}$ mice. Weight (in g) is expressed as mean ± SEM of n=8 animals per group per time.

Likewise, plasma concentration of total cholesterol, HDL and LDL was equivalent in all groups irrespective of ^{137}Cs concentrations (**Table 2**).

		ApoE$^{-/-}$			
		Cs 0	**Cs 4**	**Cs 20**	**Cs 100**
6 months exposure	**Cholesterol (mmol/l)**	11,89 ± 1,12	9,97 ± 1,91	9,08 ± 2,05	11,55 ± 1,8
	HDL (mmol/l)	3, 38 ± 0,14	2,54 ± 0,39	2,92 ± 0,46	3,01 ± 0,38
	LDL (mmol/l)	8,1 ± 0,71	6,81 ± 1,64	6,31 ± 1,53	7,36 ± 1,43
9 months exposure	**Cholesterol (mmol/l)**	10,99 ± 1,62	9,3 ± 1,89	12,08 ± 0,67	13,88 ± 1,27
	HDL (mmol/l)	2,8 ± 0,29	2,47 ± 0,4	2,97 ± 0,1	3,21 ± 0,12
	LDL (mmol/l)	7,27 ± 1,15	6,36 ± 1,2	8,2 ± 0,36	9,32 ± 0,61

Table 2. Evaluation of cholesterol, LDL and HDL plasma content following a 6 and a 9 months chronic exposure to ^{137}Cs. Chronic ^{137}Cs exposure does not influence lipidic parameters. Results are expressed as mean ± SEM of n= 8 animals per group per time.

Chronic exposure to 100 kBq.L^{-1} ^{137}Cs does not influence plaque size but it alters plaque inflammatory profile

Atherosclerotic lesion size was measured in the aortic sinus of ApoE$^{-/-}$ mice. No differences in plaque area were observed between ^{137}Cs-exposed animals and non-exposed animals **(figure 3)**.

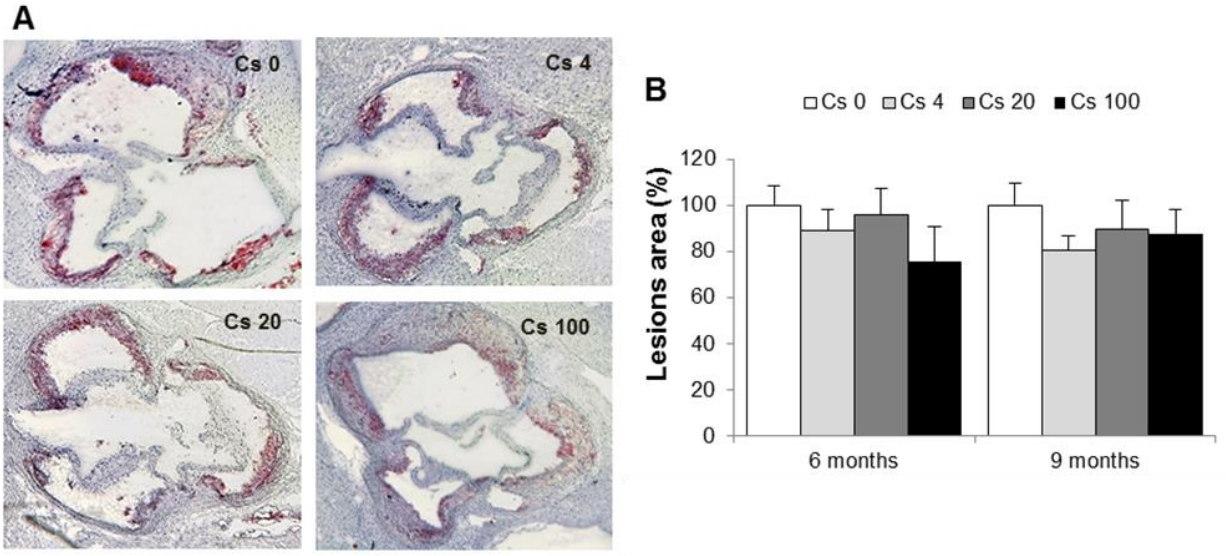


Figure 3. Atheromatous lesion area is not modified by a 6 or 9 months chronic internal exposure to ^{137}Cs. **A:** Representative pictures of oil red O staining on aortic sinus cryosections after 6 months of exposure (magnification x50). **B:** Quantification of the average lesion area performed using Histolab software. Lesion areas are expressed as mean ± SEM of n=5-7 sections per animal.

Nevertheless, we investigated lesion composition in all groups. Macrophages are one of the major inflammatory cell types implicated in atherosclerosis progression and often the most abundant cells within lesions. To quantify macrophages within plaques, we performed a CD68 immunostaining. Our results show a decrease in $CD68^+$ staining in lesions of mice exposed to 20 and 100 $kBq.L^{-1}$ ^{137}Cs during 6 months (Cs 20: 54.0% ± 10.0%; Cs 100: 45.5% ± 7.7%) compared to non-exposed mice (**figure 4 A, B**). At the 9 month time point, these differences were no longer apparent (**figure 4**).

Chemokine and adhesion molecule expression are key elements in the recruitment and diapedesis of monocytes in the vascular wall. Once inside the atherosclerotic lesion, most of these cells are transformed into macrophages. In keeping with the reduced macrophage content observed in plaques of mice exposed to ^{137}Cs, we found a parallel decrease in the mRNA expression of many pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules, measured by RT-qPCR, in their aortas *(***figure 5***)*. Specifically, aortic mRNA expression of CRP, TNF-α, MCP-1, IFNγ, VCAM-1, and E-Sel were significantly decreased in ApoE$^{-/-}$ mice exposed during

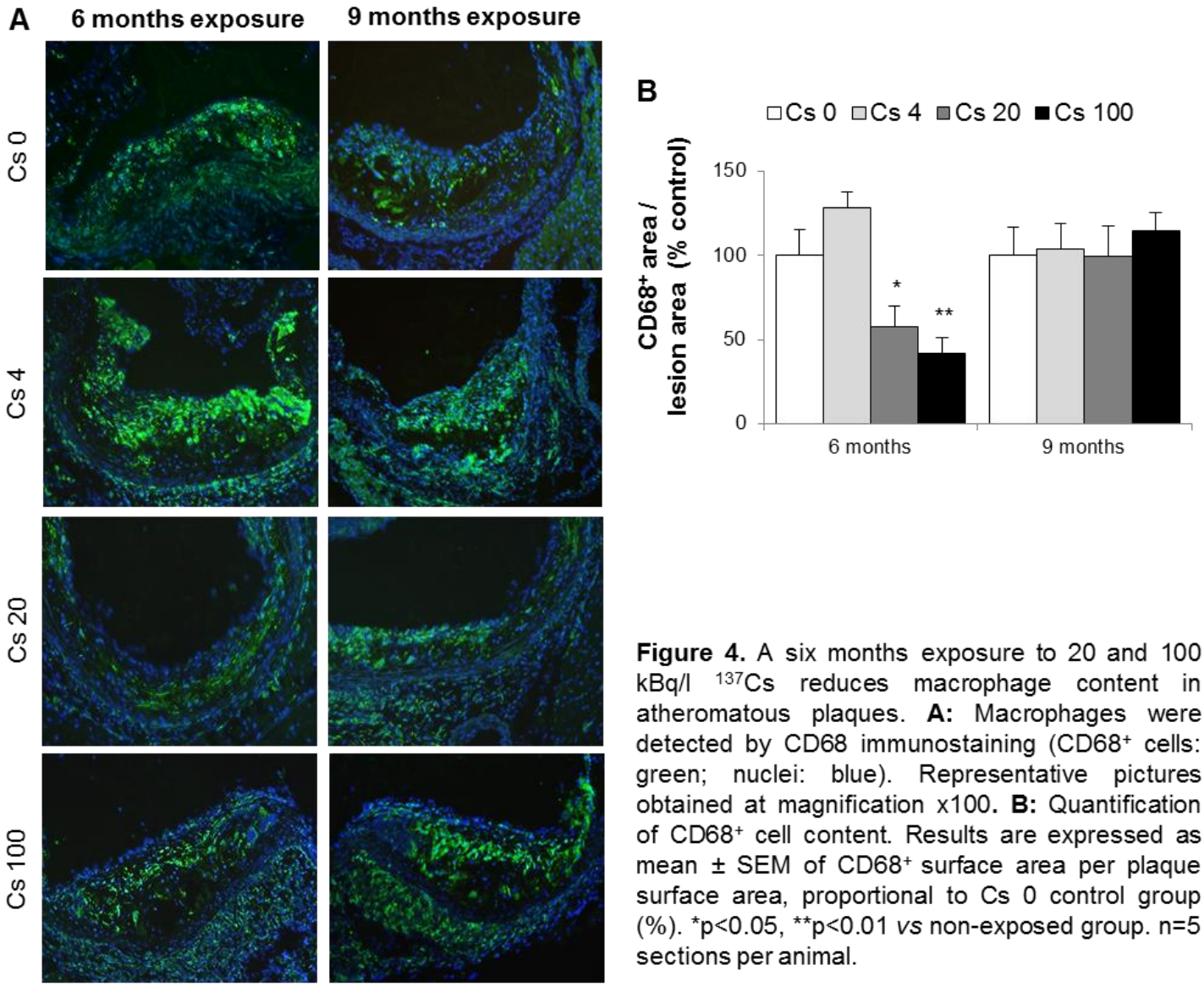


Figure 4. A six months exposure to 20 and 100 kBq/l ^{137}Cs reduces macrophage content in atheromatous plaques. **A:** Macrophages were detected by CD68 immunostaining (CD68^{+} cells: green; nuclei: blue). Representative pictures obtained at magnification x100. **B:** Quantification of CD68^{+} cell content. Results are expressed as mean ± SEM of CD68^{+} surface area per plaque surface area, proportional to Cs 0 control group (%). *$p<0.05$, **$p<0.01$ *vs* non-exposed group. n=5 sections per animal.

6 months to 100 kBq.L^{-1} ^{137}Cs (0.30 ± 0.07-fold, 0.23 ± 0.07-fold, 0.43 ± 0.13-fold, 0.21 ± 0.04-fold, 0.25 ± 0.09-fold, and 0.22 ± 0.10-fold, respectively, compared to un-exposed controls). TNF-α, ICAM-1, VCAM-1, and E-SEL mRNA expression were also significantly decreased after 9 months ^{137}Cs exposure (0.36 ± 0.14-fold, 0.40 ± 0.06, 0.52 ± 0.07-fold, and 0.46 ± 0.19-fold respectively). Although aortic MCP-1 mRNA was no longer lowered at 9 months, serum levels of the chemokine were significantly decreased after 9 months 100 kBq.L^{-1} ^{137}Cs exposure in ApoE$^{-/-}$ mice compared to non-exposed animals (0.13 ± 0.06-fold, $P<0.01$). Hence, ^{137}Cs exposure diminishes chemokine and adhesion molecule expression in ApoE$^{-/-}$ mice, associated with reduced inflammatory cell content in atherosclerotic lesions.

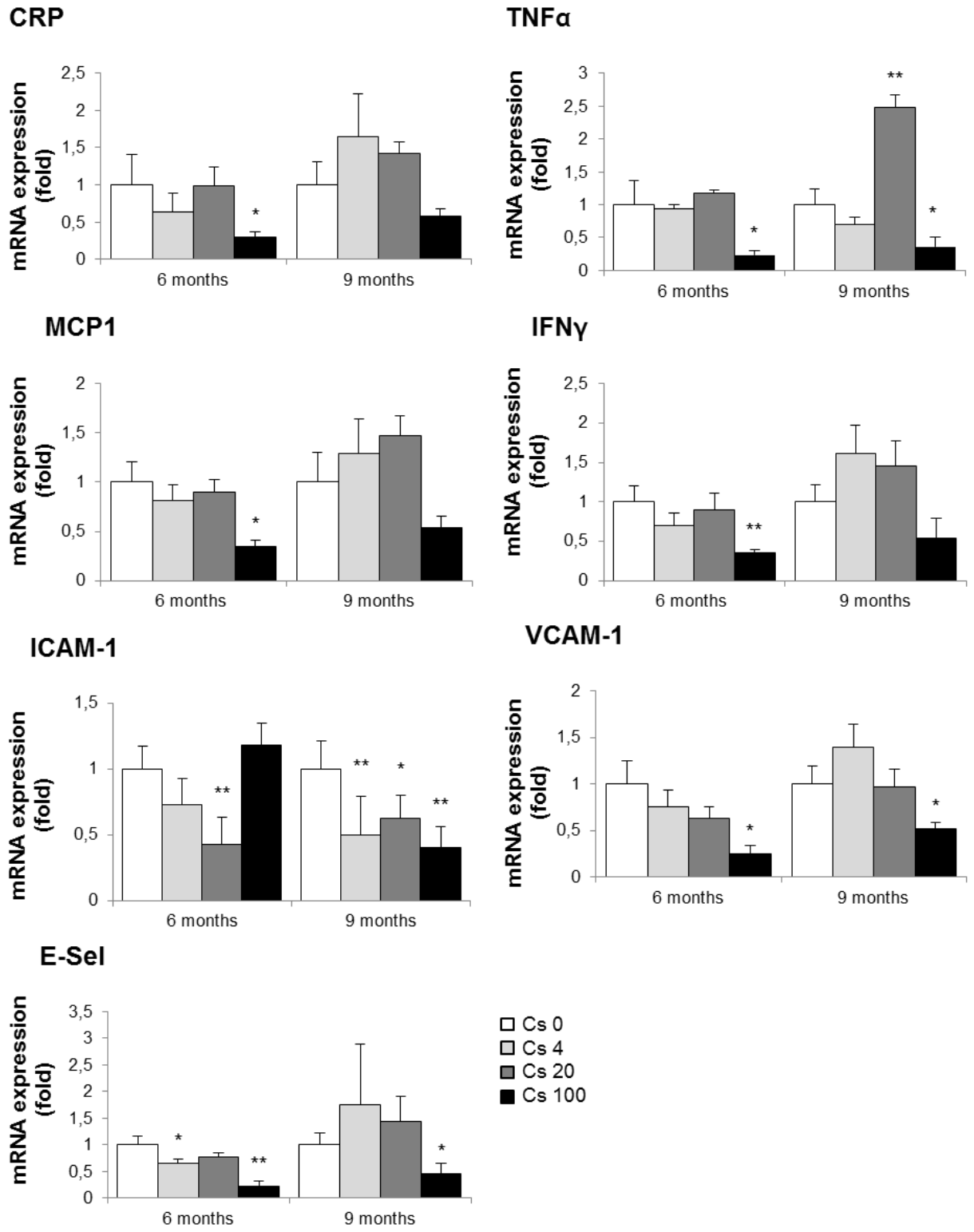


Figure 5. Aortic mRNA expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules following a 6 or 9 month exposure to ^{137}Cs. Levels of CRP, TNFα, MCP1, IFNγ, ICAM-1, VCAM-1 and E-Sel expression were determined by RT-qPCR. GAPDH or HPRT were amplified and used as endogenous control. At 6 months, CRP, TNFα, MCP1, IFNγ, VCAM-1 and E-Sel expression was significantly decreased in animals exposed to 100 kBq/l ^{137}Cs compared with non-exposed animals; at 9 months, TNFα, ICAM-1, VCAM-1 and E-Sel expression was significantly reduced. Results are expressed as mean of fold change ± SEM of n=5-8 per group per time. *$p < 0.05$ and **$p<0.01$ versus Cs 0 control group.

Exposure to 100 kBq.L^{-1} ^{137}Cs increases plaque stability in ApoE$^{-/-}$ mice

The absence of effects of ^{137}Cs on plaque size, despite diminished macrophage content, suggested that other lesion components might be affected by the treatment. Immunohistochemistry for αSMA, detecting smooth muscle cells (**figure 6 A, B**), and picrosirius red staining for collagen (**figure 6 C**) showed accentuated levels of both proteins in plaques from ApoE$^{-/-}$ mice exposed to ^{137}Cs. In fact, the 9 month exposure to 20 kBq.L^{-1} doubled αSMA levels to 220.7 ± 15.4%, compared with non-exposed controls (100% ± 24.1; $p<0.05$). Similarly, quantification of picrosirius red revealed a significant increase in collagen within the plaques of mice exposed to 100 kBq.L^{-1} ^{137}Cs during 6 (159 ± 20%) and 9 months (137 ± 13%) compared with non–exposed animals (100 ± 14% and 100 ± 11%, respectively, at 6 and 9 months) (**figure 6 C, D**). Finally, type III collagen mRNA expression was also found to be enhanced 2-fold in the aorta of animals exposed to 20 and 100 kBq.L^{-1} ^{137}Cs during 9 months ($p<0.05$) compared to non-exposed animals (**figure 6 E**).

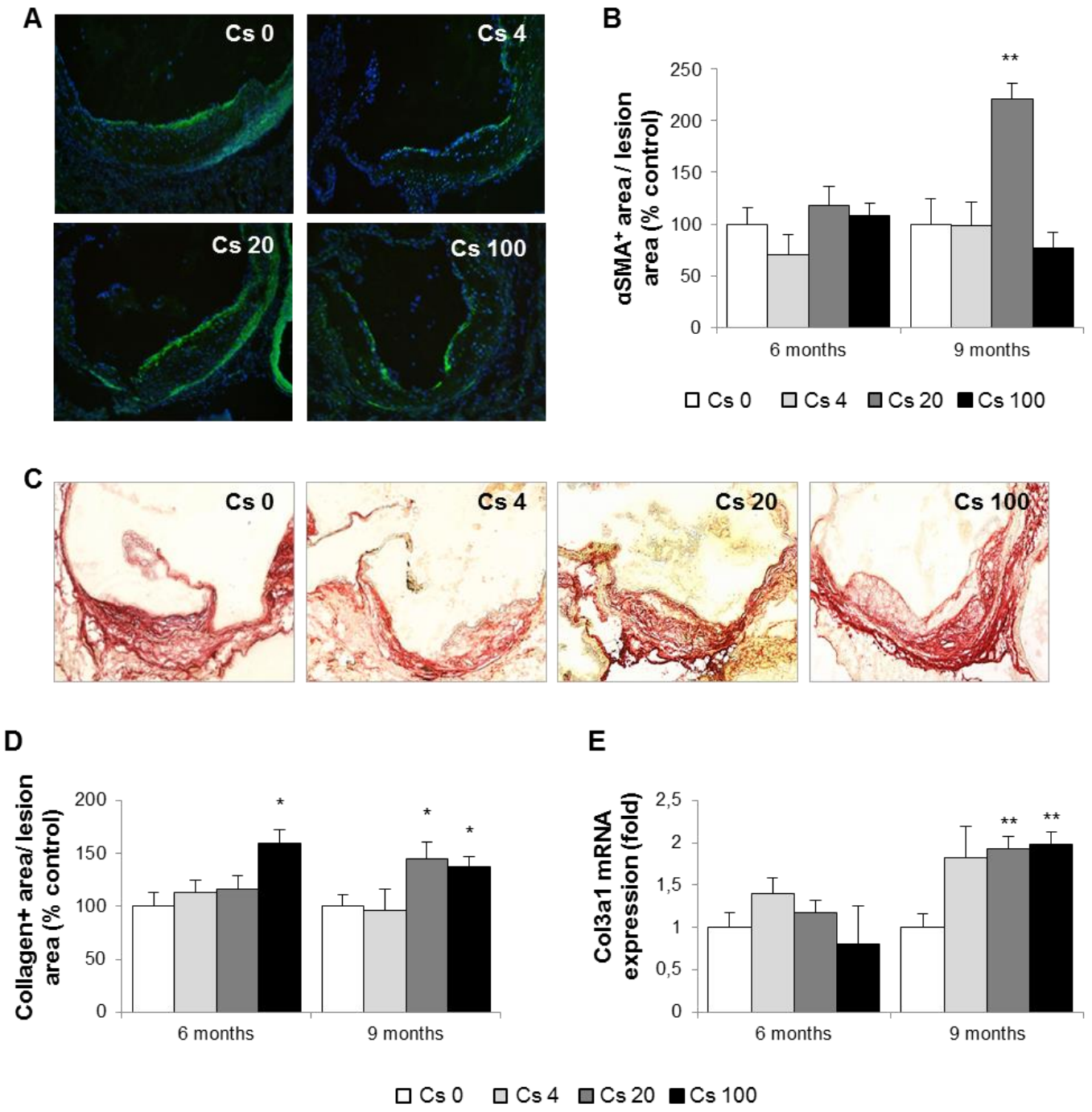


Figure 6. Indices of atheromatous plaque stability are enhanced after 9 months exposure to 100 kBq/l ^{137}Cs. **A:** αSMA immunostaining for smooth muscle cells (αSMA$^+$ cells: green; nuclei: blue, n=5 sections per animal) and B: αSMA quantification within the plaques. No difference is observed after 6 months exposure, however, after 9 months exposure, a significant increase in αSMA$^+$ area is noted for the group exposed to 20 kBq/l. **C:** Picrosirius red staining for collagen was performed on aortic sinus cryosections. Representative images obtained at magnification x100. n=5 sections per animal. **D:** Quantification of collagen in the plaque. After 6 and 9 months of exposure to 100 kBq/l ^{137}Cs, collagen content was increased in lesions. **E:** This result was paralleled by an increase in col3 mRNA expression, assessed by RT-qPCR, in the whole aorta. Results are expressed as mean ± SEM of n=5-8. *$p<0.05$ *vs* Cs 0 control.

In plaques, collagen is generally synthesized by smooth muscle cells and degraded by of matrix metalloproteinases (MMP) **(39)**. Hence, we measured MMP2, MMP3 and MMP8 levels in aortic protein extracts by Milliplex assay, and determined aortic MMP13 mRNA expression by RT-qPCR. No differences in MMP-2 or MMP-3 expression were observed between the different groups (**figure 7 A, B**). However, we observed a significant decrease in both MMP8 (0.34 ± 0.04-fold) and MMP13 (0.33 ± 0.05-fold) in animals exposed to 100 kBq.L^{-1} ^{137}Cs during 6 months, compared with non-exposed animal (**figure 7 C, D**).

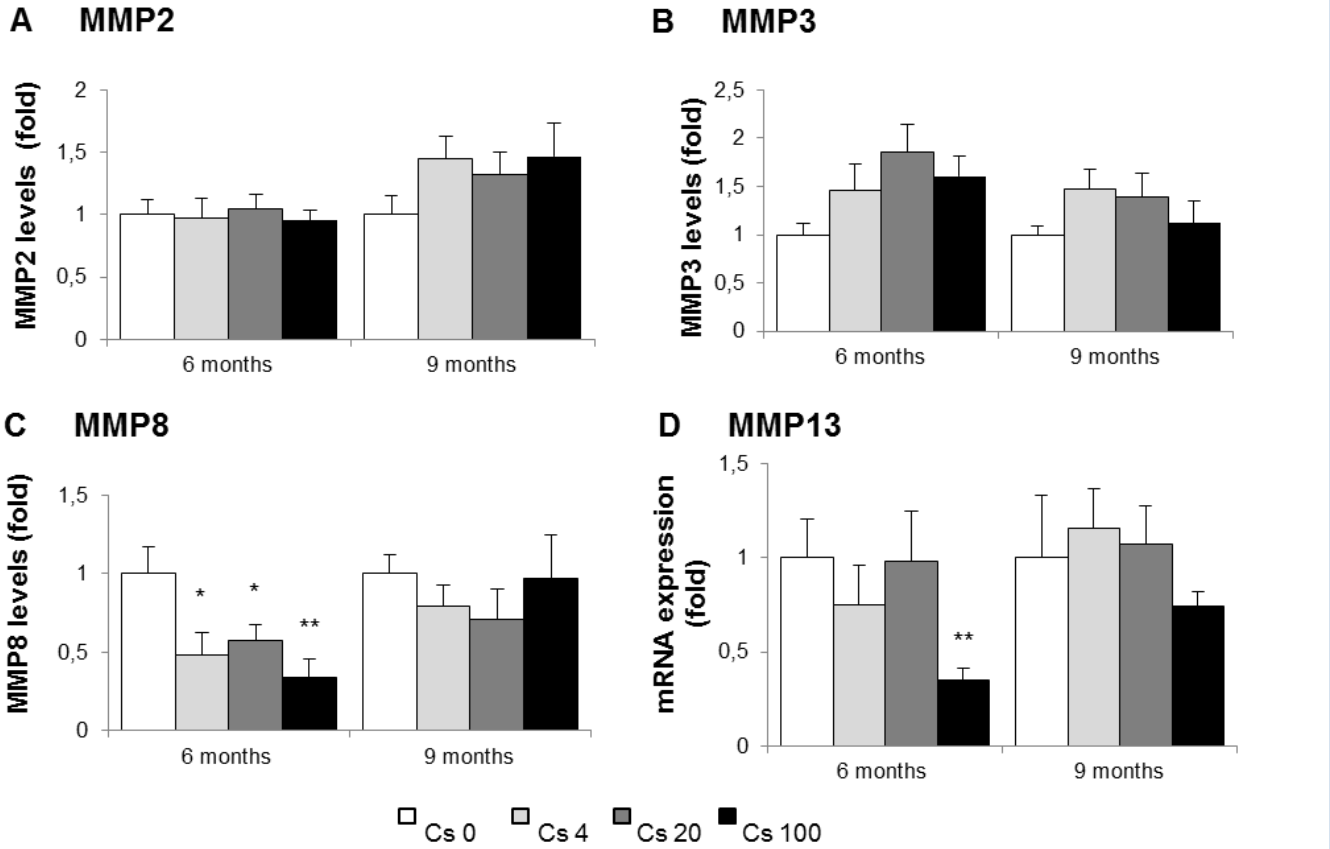


Figure 7. Aortic expression of MMP-2, -3, -8 and -13 mRNA after 6 or 9 months exposure to ^{137}Cs. MMP aorta expression was evaluated using milliplex kit (for MMP2, -3 and -8) and by RT-qPCR for MMP13. **A and B** : No differences were observed for MMP2 and MMP3 expression levels at every ^{137}Cs concentration and time exposure. **C and D** : concerning MMP8 and MMP13, we noticed a significant decrease for ApoE$^{-/-}$ Cs100 after 6 months exposure. However, after 9 months, levels of MMP8 and -13 for this group are similar to control level. Results are expressed as mean ± SEM of n = 5-8 animals per group per time. **p<0.01 *vs* control.

Finally, we evaluated MMP-2/MMP-9 activity by in-situ gelatinase activity, and found no differences between groups (**figure 7 E**). In summary, ^{137}Cs exposure enhances two parameters associated with increased plaque stability, collagen content and smooth muscle cell content.

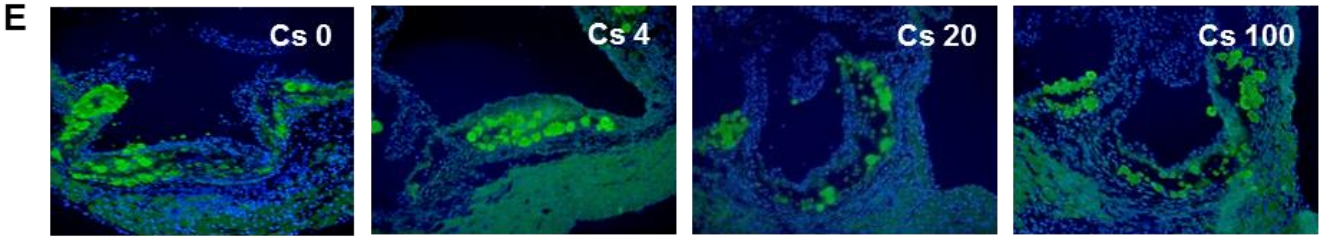


Figure 7. E: *In-situ* gelatinase activity, detected by enhanced fluorescence of fluorogenic gelatin substrate within the plaques and no difference were observed in MMP activity whatever the group.

Exposure to 100 kBq.L^{-1} ^{137}Cs has little effect on redox balance in ApoE$^{-/-}$ mice

Oxidative stress is a critical feature of atherosclerosis, contributing to endothelial dysfunction, LDL oxidation, upregulation of inflammatory pathways, and MMP induction. We first evaluated plaque superoxide production by dihydroethidium (DHE) staining. No differences were noted between the different groups of animals (**figure 8 A**).

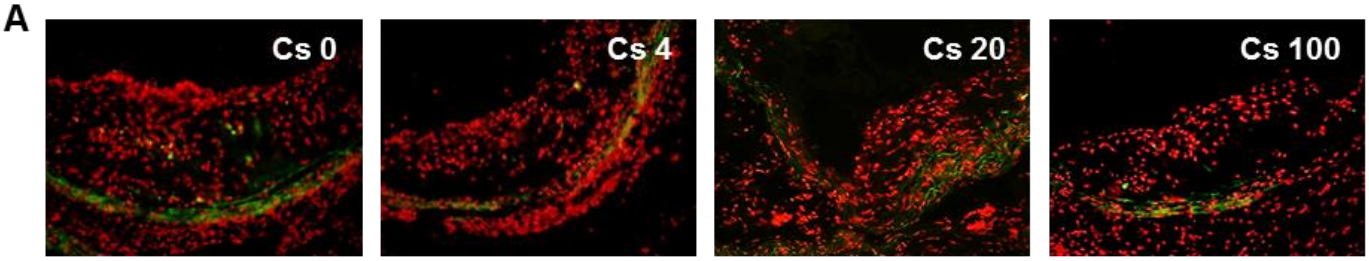


Figure 8. Changes in oxidative stress and related enzyme expression after 6 or 9 months exposure to ^{137}Cs. **A:** Representative images of superoxide production within the atheromatous plaques evaluated by DHE staining after 9 months exposition (magnification x 200). n=5 sections per animal.

The aortic mRNA expression of HO-1 and Nrf2, two factors implicated in the oxidative stress response, was also equivalent in all mice (**figure 8 B**). However, mRNA expression of GPx, an anti-oxidative enzyme, was reduced after 6 months exposure to ^{137}Cs at 100 kBq.L^{-1} compared with non-exposed animals (0.48 ± 0.05-fold), but no significant difference was observed in GPx activity at this time point (**figure 8 C**). On the contrary, after 9 months exposure, GPx activity was increased in 100 kBq.L^{-1} ^{137}Cs-exposed animals compared with non-exposed animals (173 ± 32%), but GPx mRNA expression did not differ from controls (**figure 8 C**).

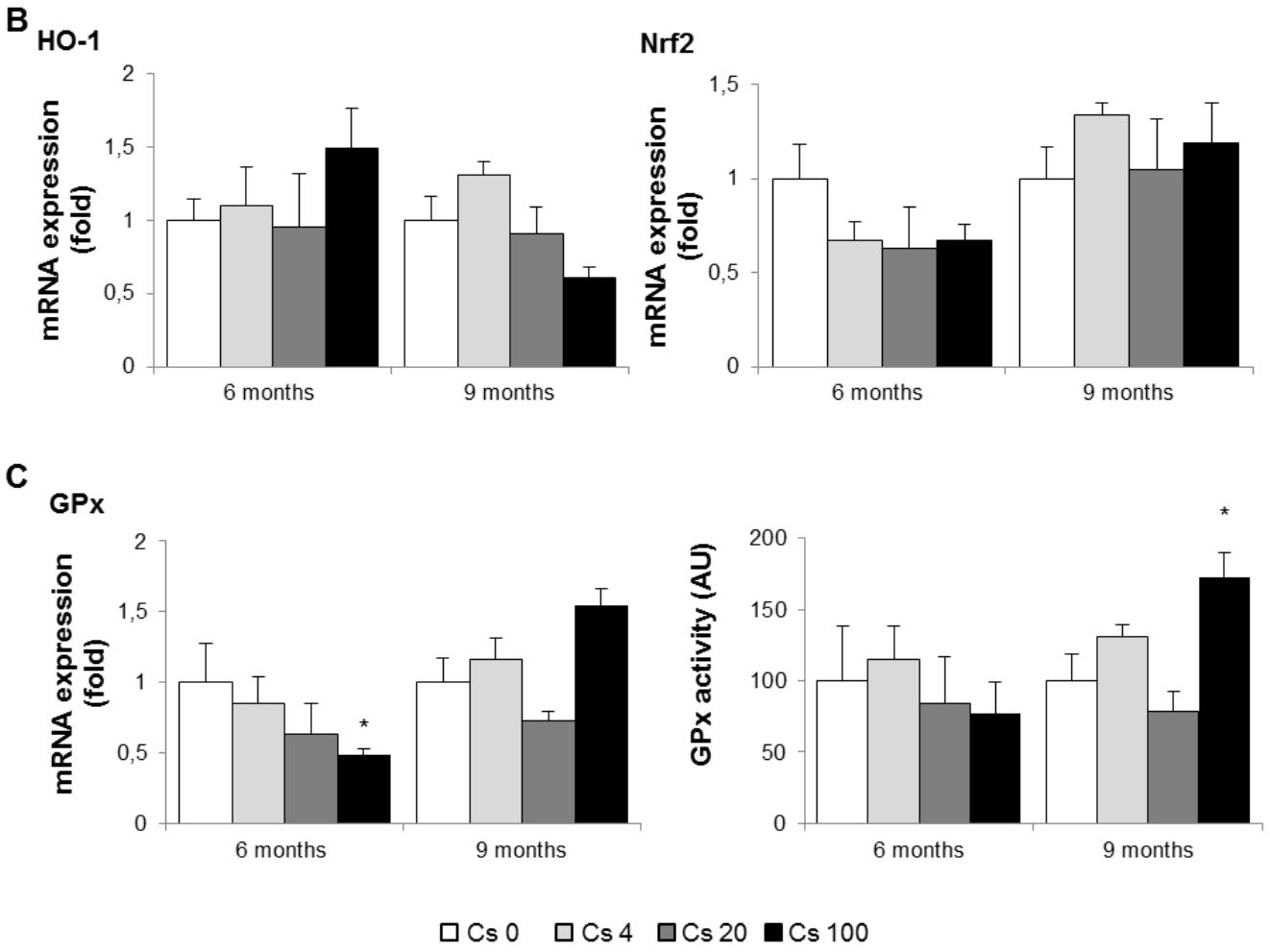


Figure 8. Changes in oxidative stress and related enzyme expression after 6 or 9 months exposure to ^{137}Cs. **B:** Qualitative analyses did not revealed any differences in aortic mRNA expression of HO-1 or Nrf2 between exposed or non-exposed groups, measured by RT-PCR. **C:** However, aortic mRNA expression of GPx was reduced at 6 months in animals exposed to 100 kBq/l ^{137}Cs. Moreover, GPx activity was significantly increased at 9 months, compared with non-exposed animals. Results are expressed as mean ± SEM of n=5-8 animals per group per time. *$p<0.05$ vs Cs 0 control group.

Discussion

Our results show that chronic, low dose ingestion of ^{137}Cs during 6 and 9 months had no consequences on plaque size and plasma lipid parameters. However, we observed a decrease in systemic pro-inflammatory cytokines expression, reduced plaque macrophage content, increased smooth muscle cells and collagen content, and lower MMP expression in ^{137}Cs-exposed mice compared to non-exposed animals. Our data therefore indicate that exposure to ^{137}Cs may actually promote a more stable plaque phenotype in mice.

Thus far, two studies tested the effects of chronic exposure to ^{137}Cs, at doses comparable to post-accident exposure, on the cardiovascular system **(18;31)**. These two studies yielded contradictory results. One reported alterations in the cardiovascular system of children who have lived in contaminated territories **(31)**, whereas the other showed subtle changes in blood pressure and in atrial expression of some genes, without any structural, pathological or clinical disorders, in an animal model **(18)**.

To the best of our knowledge, this is the first work investigating the effects of a chronic internal low dose exposure to ^{137}Cs on atherosclerosis development and progression. Internal exposure to ^{137}Cs during several months was previously reported to have no significant effects in different physiological systems (digestive system, central nervous system and immune system) in mice **(40-42)**. However, most experimental studies on irradiation and atherosclerosis exposed animals to external ionizing radiation for a short time. The results ranged from an increase in inflammation and atherosclerosis progression with high doses **(3)**, to decreased atherosclerosis with very low doses administered at a low dose rate **(43)**. In comparison, our study demonstrated that chronic, low-dose ^{137}Cs induced no significant modifications in atherosclerotic plaque size. Our results are in line with those of *Mitchel et al* **(43)**. They reported that a certain dose given at a low dose-rate (1 mGy/min) is protective against atherosclerotic lesion development whereas the same dose given at a high dose-rate (150 mGy/min) increases plaque size at late stages of the pathology. The importance of the dose-rate even after chronic low-dose exposure was confirmed in a model of premature senescence in cultured endothelial cells **(44)**. Interestingly, the dose-rate

during internal contamination, the chosen route of exposure in our study, is around 6 µGy/h, which is much lower than that used in previous works.

Our investigation of the effects of chronic ^{137}Cs exposure revealed that indices of inflammation were actually reduced in exposed mice compared with non-exposed mice. Indeed, we observed a decrease in CRP, TNFα, MCP-1, and IFNγ, associated with a decrease in macrophage content within the plaques, after 6 months ^{137}Cs exposure. Many of these effects persisted at 9 months. Our results are in accordance with some reports showing the anti-inflammatory effect of low-dose irradiation **(40;45)** and of low dose radiotherapy (<1Gy or fractionated) **(46-48)**. Moreover, a previous study highlighted that the anti-inflammatory effect of low dose radiotherapy, which reduced adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro in the absence of effects on adhesion molecule expression **(49)**. However, chronic ingestion of 20 $kBq.L^{-1}$ had no impact on leukocyte or lymphocyte numbers **(24;42)**. In our model, ^{137}Cs exposure diminished expression of ICAM-1, VCAM-1 and E selectin, further contributing to the potential protective effects of exposure. Hence, the reduced levels of macrophages within the plaques of ^{137}Cs-exposed mice was probably due to diminished pro-inflammatory cytokines (CRP, TNF-α, MCP-1, IFN-γ), but could also be partially explained by a reduction in adhesion molecules. After 9 months, TNF-α, ICAM-1 and VCAM-1 expression was still attenuated in exposed mice, but macrophage content no longer differed between Cs-exposed and unexposed mice. This may be ascribed in part to local proliferation on CD68+ cells, as recently demonstrated **(50)**.

In our study, reduced plaque macrophage content after 6 months to ^{137}Cs suggested a potential increase in stability. Interestingly, most clinical manifestations of atherosclerosis are related to plaque instability rather than lesion size. Vulnerable human atherosclerotic plaques are characterized by increased accumulation of macrophages, a large lipid pool, a thin fibrous cap, and decreased smooth muscle cell and collagen content; these plaques are more prone to rupture than stable plaques **(51-53)**. Plaque rupture is an uncommon occurrence in murine models of atherosclerosis. However many morphologic features of atheroma that are prone to plaque rupture in humans can be seen in murine lesions **(54)**. Accumulated macrophages not only become foam cells that eventually become major

constituents of the necrotic lipid core, they also synthesize and secrete matrix metalloproteinases which destroy collagen and thereby weaken the fibrous cap **(23;55)**. Moreover, some reviews have emphasized the role of VSMCs in maintaining the integrity of plaque, in part through collagen synthesis, and suggested that VSMC proliferation may be beneficial to plaque stability **(56)**. Nevertheless, inflammation can inhibit collagen I and III production **(57)** and stimulate MMP production **(55)** by VSMC. In our study, we found that 6 months of ^{137}Cs exposure was associated with reduced inflammatory mediators, lower CD68+ staining, and diminished expression of MMP8 and MMP13. At 9 months, plaque macrophage numbers were equivalent in exposed and non-exposed mice, but VSMC content was enhanced. In parallel, collagen content and collagen gene expression were increased. *Schiller et al* **(58)** demonstrated macrophage rich and collagen poor lesions in the aortic roots of irradiated LDLR$^{-/-}$ mice after acute high dose (10 Gy) total body irradiation. Another group **(59)** also observed a decrease in VSMC and an increase in macrophages, coupled with higher levels of MMP8, in irradiated arteries. Thus, there truly appears to be a dose effect related to beneficial or adverse impacts of radiation on markers of plaque stability. Differences in levels of inflammation may very well underlie the opposite outcomes of high and low radiation exposure.

We hypothesized that changes in oxidative stress levels could account for the lower inflammatory profile of mice after ^{137}Cs exposure. In a model of granulomatous disease, the anti-inflammatory effect of irradiation was correlated with an increase expression of oxidative stress parameters like HO-1 **(60)**. Similarly, it was shown that low doses of X-rays modulate the oxidative burst, which plays an anti-inflammatory role by reducing activated macrophages **(61)**. These observations could be attributed to hormesis, whereby a damaging agent causing a mild stress response results in a beneficial effect. Whereas high doses of radioactivity increase oxidative stress and inflammation significantly, low doses on the contrary modulate oxidative stress and inflammation **(62-63)**. However, in our experimental model we did not observe any striking difference in oxidative stress parameters after ^{137}Cs exposure. The reduced expression of the anti-oxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) at 6 months was counterbalanced by increased GPx activity at 9 months. Moreover, plaque

ROS status, measured by DHE staining, was not altered by ^{137}Cs exposure. In summary, changes in oxidative stress are unlikely to explain the decreased in pro-inflammatory parameters and reduced macrophage content in plaques observed in mice exposed to ^{137}Cs.

The limitations of the current work include the use of young animals and reliance on the mouse model, in which plaques are not rupture-prone. Nevertheless, our study demonstrates that chronic low dose internal exposure to ^{137}Cs, comparable to what is found in contaminated territories, does not potentiate atherosclerosis progression. On the contrary, we observed that such exposure enhances the stability of atherosclerotic plaques in $ApoE^{-/-}$ mice, by inhibiting the expression of inflammatory cytokines and stimulating accumulation of collagen within the plaques.

Acknowledgements: The authors wish to thanks V. Joffres and D. Lurmin for secretarial assistance and F. Voyer, T. Loiseau and JM Guischet for expert animal care. V. Buard and C. Strup for their advices for *in situ* zymography analysis. This work was supported by grants from Electricite de France (EDF). Stephanie Lehoux, is the recipient of a Canada Research Chair and is supported by the Canadian Foundation for innovation and the Canadian institutes of health research.

References

1. Stewart, F.A., et al., Ionizing radiation accelerates the development of atherosclerotic lesions in ApoE-/- mice and predisposes to an inflammatory plaque phenotype prone to hemorrhage. Am J Pathol, 2006. **168**(2): p. 649-58.

2. Yu, T., et al., Iron-ion radiation accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Radiat Res, 2011. **175**(6): p. 766-73.

3. Hoving, S., et al., Single-dose and fractionated irradiation promote initiation and progression of atherosclerosis and induce an inflammatory plaque phenotype in ApoE(-/-) mice. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **71**(3): p. 848-57.

4. Adams, M.J., et al., Cardiovascular status in long-term survivors of Hodgkin's disease treated with chest radiotherapy. J Clin Oncol, 2004. **22**(15): p. 3139-48.

5. Darby, S., et al., Mortality from cardiovascular disease more than 10 years after radiotherapy for breast cancer: nationwide cohort study of 90 000 Swedish women. BMJ, 2003. **326**(7383): p. 256-7.

6. Wong, F.L., et al., Effects of radiation on the longitudinal trends of total serum cholesterol levels in the atomic bomb survivors. Radiat Res, 1999. **151**(6): p. 736-46.

7. Azizova, T.V., et al., Cerebrovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948-1958. Radiat Res, 2010. **174**(6): p. 851-64.

8. Azizova, T.V., et al., Cardiovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948-1958. Radiat Res, 2010. **174**(2): p. 155-68.

9. Little, M.P., et al., A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms. Radiat Res, 2008. **169**(1): p. 99-109.

10. IAEA, Environmental consequences of Chernobyl accident and their remediation: Twenty years of experience. Report of the Chernobyl Forum Expert Group "Environment" (Vienna: IAEA), 2006.

11. ICRP, Dose coefficients for intakes of radionuclides by workers report of a task group of committee 2 of the international commission on radionuclides by workers and task group of committee 2 of the international commission on radiological protection, 1994. **ICRP24**: p. 1-83.

12. Takatsuji, T., Sato, H., Takada, J., Endo, S., Hoshi, M., Sharifov, V. F., Veselkina, II, Pilenko, I. V., Kalimullin, W. A., Masyakin, V. B., Kovalev, A. I., Yoshikawa, I. and Okajima, S. (2000). "Relationship between the 137Cs whole-body counting results and soil and food contamination in farms near Chernobyl." Health Phys **78**(1): 86-89.

13. Kharchenko, V.P., B.M. Rassokhin, and G.A. Zubovskii, [Value of bone densitometry in the determination of vertebral mineral density in participants of the clean-up after Chernobyl accident]. Med Tr Prom Ekol, 2001(2): p. 29-32.

14. Vykhovanets, E.V., et al., Analysis of blood lymphocyte subsets in children living around Chernobyl exposed long-term to low doses of cesium-137 and various doses of iodine-131. Radiat Res, 2000. **153**(6): p. 760-72.

15. Kovaleva, L.I., P.N. Liubchenko, and T.V. Basakova, [The central hemodynamics of participants in the cleanup of the sequelae of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station 4 years after the accident]. Gig Tr Prof Zabol, 1992(3): p. 15-7.

16. Bandazhevskaya, G.S., et al., Relationship between caesium (137Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in 'Chernobyl' children -- preliminary observations after intake of oral apple pectin. Swiss Med Wkly, 2004. **134**(49-50): p. 725-9.

17. Cwikel, J.G., et al., Blood pressure among immigrants to Israel from areas affected by the Chernobyl disaster. Public Health Rev, 1997. **25**(3-4): p. 317-35.

18. Gueguen, Y., et al., Chronic contamination of rats with 137 cesium radionuclide: impact on the cardiovascular system. Cardiovasc Toxicol, 2008. **8**(1): p. 33-40.

19. Libby, P., Inflammation in atherosclerosis. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.

20. Libby, P., Changing concepts of atherogenesis. J Intern Med, 2000. **247**(3): p. 349-58.

21. Gorenne, I., et al., Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. Cardiovasc Res, 2006. **72**(1): p. 9-17.

22. Burleigh, M.C., et al., Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations. Atherosclerosis, 1992. **96**(1): p. 71-81.

23. Galis, Z.S., et al., Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. Circ Res, 1994. **75**(1): p. 181-9.

24. Cozlea, D.L., et al., The impact of C reactive protein on global cardiovascular risk on patients with coronary artery disease. Curr Health Sci J, 2013. **39**(4): p. 225-31.

25. Nakashima, Y., et al., ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 133-40.

26. Meir, K.S. and E. Leitersdorf, Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1006-14.

27. Bertho, J.M., et al., Biodistribution of (137)Cs in a mouse model of chronic contamination by ingestion and effects on the hematopoietic system. Radiat Environ Biophys, 2010. **49**(2): p. 239-48.

28. Handl, J., et al., Evaluation of radioactive exposure from 137Cs in contaminated areas of Northern Ukraine. Health Phys, 2003. **84**(4): p. 502-17.

29. Hoshi, M., et al., Radiocesium in children residing in the western districts of the Bryansk Oblast from 1991-1996. Health Phys, 2000. **79**(2): p. 182-6.

30. Puhakainen, M., T. Heikkinen, and T. Rahola, Levels of 90Sr and 137Cs in the urine of Finnish people. Radiat Prot Dosimetry, 2003. **103**(3): p. 255-62.

31. Bandazhevsky, Y.I., Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. Swiss Med Wkly, 2003. **133**(35-36): p. 488-90.

32. Dam, K., F.J. Seidler, and T.A. Slotkin, Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration. Brain Res Dev Brain Res, 1998. **108**(1-2): p. 39-45.

33. Joven, J., et al., The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain. Atherosclerosis, 2007. **195**(2): p. e85-92.

34. ICRP, The concept and use of reference animals and plants. Publication 108 Environmental protection, 2008. **Ann ICRP38**(Pergamon press (oxford)): p. 1-242

35. Bertho, J.M., Absorbed radiation doses due to chronic ingestion of cesium-137 or Strontium-90 by mice. . Radioprotection, 2012. **47**: p. 219-230.

36. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

37. Daugherty, A. and S.C. Whitman, Quantification of atherosclerosis in mice. Methods Mol Biol, 2003. **209**: p. 293-309.

38. Whitman, S.C., et al., Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. Am J Pathol, 2000. **157**(6): p. 1819-24.

39. Newby, A.C., Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. Physiol Rev, 2005. **85**(1): p. 1-31.

40. Arenas, M., et al., Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy. Indications, dose, and radiobiological mechanisms involved. Strahlenther Onkol, 2012. **188**(11): p. 975-81.

41. Dublineau, I., et al., Effects of chronic 137Cs ingestion on barrier properties of jejunal epithelium in rats. J Toxicol Environ Health A, 2007. **70**(10): p. 810-9.

42. Bertho, J.M., et al., Influence on the mouse immune system of chronic ingestion of 137Cs. J Radiol Prot, 2011. **31**(1): p. 25-39.

43. Mitchel, R.E., et al., Low-dose radiation exposure and atherosclerosis in ApoE(-)/(-) mice. Radiat Res, 2011. **175**(5): p. 665-76.

44. Yentrapalli, R., et al., Quantitative proteomic analysis reveals induction of premature senescence in human umbilical vein endothelial cells exposed to chronic low-dose rate gamma radiation. Proteomics, 2013. **13**(7): p. 1096-107.

45. Kataoka, T., Study of antioxidative effects and anti-inflammatory effects in mice due to low-dose X-irradiation or radon inhalation. J Radiat Res, 2013. **54**(4): p. 587-96.

46. von Pannewitz, G., [Radiotherapy of arthrosis deformans. Method and results]. Radiologe, 1970. **10**(2): p. 51-4.

47. Trott, K.R., R. Parker, and M.P. Seed, [The effect of x-rays on experimental arthritis in the rat]. Strahlenther Onkol, 1995. **171**(9): p. 534-8.

48. Hildebrandt, G., et al., Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats. Int J Radiat Biol, 2003. **79**(12): p. 993-1001.

49. Kern, P.M., et al., Low-dose radiotherapy selectively reduces adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro. Radiother Oncol, 2000. **54**(3): p. 273-82.

50. Robbins, C.S., et al., Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. Nat Med, 2013. **19**(9): p. 1166-72.

51. Virmani, R., et al., Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.

52. Aikawa, M. and P. Libby, Lipid lowering therapy in atherosclerosis. Semin Vasc Med, 2004. **4**(4): p. 357-66.

53. Virmani, R., et al., Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(10): p. 2054-61.

54. Falk, E., et al., Neointimal cracks (plaque rupture?) and thrombosis in wrapped arteries without flow. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 248-9; author reply 250-2.

55. Galis, Z.S., et al., Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2493-503.

56. Weissberg, P.L., G.J. Clesham, and M.R. Bennett, Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial? Lancet, 1996. **347**(8997): p. 305-7.

57. Amento, E.P., et al., Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(5): p. 1223-30.

58. Schiller, N.K., et al., Participation of macrophages in atherosclerotic lesion morphology in LDLr-/- mice. J Lipid Res, 2004. **45**(8): p. 1398-409.

59. Pakala, R., et al., Radiation-induced atherosclerotic plaque progression in a hypercholesterolemic rabbit: a prospective vulnerable plaque model? Cardiovasc Radiat Med, 2003. **4**(3): p. 146-51.

60. Hildebrandt, G., et al., Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy. Int J Radiat Biol, 1998. **74**(3): p. 367-78.

61. Schaue, D., B. Marples, and K.R. Trott, The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages. Int J Radiat Biol, 2002. **78**(7): p. 567-76.

62. Randolph, G.J., Proliferating macrophages prevail in atherosclerosis. Nat Med, 2013. **19**(9): p. 1094-5.

63. Calabrese, E.J., E.J. Stanek, 3rd, and M.A. Nascarella, Evidence for hormesis in mutagenicity dose-response relationships. Mutat Res, 2011. **726**(2): p. 91-7.

RESULTATS *IN VITRO*

I – ETUDE *IN VITRO* IRRADIATION CHRONIQUE À FAIBLE DOSE ET FAIBLE DÉBIT DE DOSE SUR DES CELLULES ENDOTHÉLIALES (HUVECS)

Cette étude s'inscrit dans le contexte d'un projet collaboratif Européen « DoReMi » (Low Dose Research towards Multidisciplinary Integration), lancé en janvier 2010. Ce programme est dédié aux recherches multidisciplinaires sur les effets des faibles doses de rayonnements ionisants.

Ce programme se divise en sept groupes de travail, parmi lesquels le groupe n°7, coordonné par l'IRSN, qui s'intéresse plus spécifiquement aux effets non-cancéreux des rayonnements.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal « Radiation Research », disponible en ligne depuis le 25 mars 2015 (*cf Annexe II*).

Chronic gamma irradiation induces a dose-rate dependent pro-inflammatory response and associated loss of function in human umbilical vein endothelial cells

[1]T. Ebrahimian, **[1]C. Le Gallic**, [1]J. Stefani, [1]I. Dublineau, [3]R. Yentrapalli [2]M. Harms-Ringdahl, [2]S Haghdoost.

1. IRSN: Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, Service de radiobiologie et d'épidémiologie, Laboratoire de RadioToxicologie Experimentale, 92262, Fontenay-aux-Roses, France.
2. Centre for Radiation Protection Research, Department Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, 106 91 Stockholm, Sweden.
3. Institute of Radiation Biology, Helmholtz Zentrum Munchen, German Research Centre for Environmental Health, Neuherberg, Germany.

Short title: Low dose rate gamma irradiation, HUVEC function and inflammation

Corresponding author:
Dr. Teni Ebrahimian
Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de RadioToxicologie Expérimentale
92262, Fontenay-aux-Roses, France
Phone: +33(1)58357007
Fax: +33(1)58358467
E-mail : teni.ebrahimian@irsn.fr

Abstract

A central question in radiation protection research is dose and dose-rate relationships for radiation-induced cardiovascular diseases. The response of endothelial cells to different low dose-rates may contribute to estimate risks for cardiovascular diseases by providing a mechanistic understanding.

In this study we investigated whether chronic low dose rate radiation exposure had an effect on inflammatory response of endothelial cells and their function.

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) were exposed chronically to 1.4 mGy/h or 4.1 mGy/h radiation for 1, 3, 6 or 10 weeks. We determined the pro inflammatory profile of HUVECs before and during the onset of radiation and the consequences on their function by measuring their capacity to form vascular networks in matrigel. Expression levels of adhesion molecules such as E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1, and the release of pro inflammatory cytokines such as MCP-1, IL-6 and TNF-α were analysed. At the same dose of 2 Gy delivered with 4.1 mGy/h we observed an increase in IL-6 and MCP-1 release on the cell culture media but not with 1.4 mGy/h. The increase in inflammatory profile induced by 4.1 mGy/h was also correlated with a decrease of HUVECs capacity to form vascular network in matrigel. Our results suggest that the dose-rate is also an important parameter in the alteration of HUVECs inflammatory profile and function.

Introduction

Even if mechanisms are not completely known, risk for cardiovascular diseases associated with high or medium doses over a few Gy of ionizing radiation are well established. For doses, such as would be received by patients treated with radiotherapy, a variety of effects (so-called deterministic or tissue reaction) are observed, resulting from cell death or premature senescence and associated functional impairment of the affected tissue. Based on the epidemiological and animal data at high doses a causality between the development of cardiovascular diseases and radiation acute exposure has been suggested **(1-3)**. Mechanisms of medium dose effects relevant to radiotherapy have been thoroughly reviewed **(4)**.

However, the effects of low dose and low dose rate exposure on the development of cardiovascular diseases are debated and of high priority for radiation protection research.

Several reviews have been published recently on the effects of radiation on circulatory diseases by focusing on the possible effects of lower doses **(5)**. The main questions are whether and how low doses could elevate the risk of cardiovascular diseases, as reported by some epidemiological studies, and if implicated mechanisms differ from high-doses effects. Low-dose-rate exposure has been reported to be protective **(6)**, whereas a high-dose-rate exposure is associated with detrimental effects **(7)**, suggesting that low doses may influence this disease by more than one mechanism and that the dose rate is an important parameter.

It is well known that inflammation is the driving force in vascular pathologies **(8; 9)** and strong evidence supports the central role of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, MCP-1 and TNF-α in vascular diseases. After lipids trans-endothelialisation within the intima and their oxidation, inflammatory cells excrete cytokines. These cytokines usually cause an increase of adhesion molecules on the cell surface such as ICAM-1, VCAM-1 or E-selectin inducing HUVEC dysfunction in terms of senescence induction or loss of function **(10)**. Importantly, at sites overlying atherosclerosis sites, loss of endothelial cell function has been observed in human aorta and coronary arterie) **(11; 12)**. Indeed, inflammation,

atherosclerosis and angiogenesis are interconnected and under hypoxia condition angiogenesis is directly enhanced by chemokines **(13; 14)**.

In fact, endothelial cells (ECs), known to be critical targets for radiation injury, appear to play a key role in the development of vascular pathologies. At the cellular level, the effects of irradiation have been studied with diverse assessment models and methods with regards to endothelial barrier damage or permeability change **(15; 16)**, cytoskeleton disruption **(17; 18)**, angiogenic capacity impediment **(19; 20)**, and premature senescence **(21; 22)**.

It was shown that depending on the dose, radiation activates ECs **(23; 24)**, or induces loss of ECs by apoptosis **(25-27)**. Endothelial cell adhesion molecules are involved in a number of cell adhesion processes that occur in the vasculature, such as adhesion and transendothelial migration of leukocytes and EC-cell adherence and migration **(28; 29)**. In fact, the endothelium is considered to be a dynamic organ with secretory, metabolic and immunological role.

It seems also important to consider the long-term effect of irradiation since recent studies suggest that persistent endothelial dysfunction could play a key role in the pathogenesis of radiation-induced tissue injury **(30; 31)**. An up-regulation of adhesion molecules expression following gamma radiation which impairs functionality of both human macro and micro-vascular endothelial cells from different tissues have been reported **(7; 32; 33)**. IL-6, TNF-α and MCP-1 are potent pro-inflammatory cytokines that are released from damaged tissue and cause the activation of the vascular endothelium. This activation results in the expression of a variety of cell surface adhesion molecules mediating leukocyte migration through the vascular endothelium. Three families of adhesion molecules, selectin immunoglobulin and integrin families are well characterized so far and have been demonstrated to be important in inflammation **(12)**. E-selectin promotes adhesion of neutrophils, monocytes and a subpopulation of lymphocytes to leukocytes interactions with glycoprotein ligands on leukocytes. Indeed, E-selectin allows cell-to-cell adhesion **(34)**.

A recent study of *Yentrapalli et al* **(22; 35)** has shown that chronic low-dose rate ionizing radiation triggers a premature senescence programme in primary human endothelial cells. In

this study, the cells showed a progressive loss of replicative capacity when the cumulative dose reached 4 Gy. Moreover, *Rombout et al* **(36)** has shown that low doses (0.05 Gy) induced subtle increases in DNA double-strand breaks in HUVEC compared to high doses. In this study they have also shown an increase in apoptotic cells down to 0.5 Gy in HUVECs.

However there is no study describing the effects of a chronic low dose irradiation to different low-dose rate range on HUVEC inflammatory profile and angiogenic function.

The aim of this study is to investigate the pro-inflammatory response of HUVECs exposed to chronic low dose irradiation and functional consequences. HUVECs were exposed chronically to different low dose rates (1.4mGy/h and 4.1mGy/h) for 1, 3, 6 or 10 weeks. Expression of pro inflammatory adhesion molecules, release of pro inflammatory cytokines, and HUVECs angiogenic function were measured.

Material and methods

Cell culture conditions and cell growth kinetics

Primary culture of HUVEC (Invitrogen, Paisley, UK) was obtained from a single donor. The HUVECs were cultured and expanded for 7 days, detached by accutase and then frozen down at -120 ºC in 2 ml cryotubes with one million cells per tube in medium with 10% DMSO. Prior to each experiment, the cells from the three cryotubes were thawed and cultured in an incubator while exposure to chronic low dose rates. The incubator was equipped with caesium^{137} source. The cell culture medium was composed of Media 200 (Invitrogen) supplemented with 2% FBS, 1 µg/µL hydrocortisone, 10 ng/mL epidermal growth factor, 10 µg/mL penicillin and 0,1 mg/mL streptomycin. The cells were cultured in a cell culture incubator at 37°C in a 95% air/5% CO_2 humidified atmosphere. Cells were passaged every seven days (5000 cells/cm^2) and culture medium changed every second day. Cells were passaged using accutase (Invitrogen) for detachment.

Chronic gamma radiation exposure

For chronic exposure (1.4 and 4.1 mGy/h) a cell culture incubator equipped with ^{137}Cs sources (CRPR, Stockholm University) was used. To evaluate the mechanisms that occur in ECs exposed to low dose irradiations, *in vitro* experiments were performed by exposing HUVECs chronically to a gamma radiation at different dose-rate (1.4 mGy/h and 4.1 mGy/h) until cells entered senescence. The chronic dose rates used in the experiments yield a total dose listed in the text. For example the total dose for 1 week at 1.4 mGy/h =1.4x24x7=0.24Gy. This goes for all the dose rate total dose calculations. Indeed, the cumulative radiation doses at these time points (1, 3, 6 and 10 weeks) for 1.4 mGy/h were 0.24 Gy, 0.71 Gy, 1.41 Gy and 2.3 Gy respectively. For 4.1 mGy/h the cumulative radiation doses were 0.69 Gy, 2.1Gy, 4.1 Gy and 6.9 Gy respectively

Cell samples were collected at different time points (1, 3, 6 and 10 weeks), and kept in -120 ºC until analysis. Prior to analysis, the cells were thawed 3 days in medium. Medium and

cells were then harvested and expression of cytokines by ELISA (R&Dsystem), adhesion molecules by western blot (abcam) and RTPCR were then analysed.

Immunoblotting analysis

Protein extracts for HUVEC were obtained by lysing cells in 200µl of buffer (20% sodium dodecylsulfate, 100mmol/L sodium orthovanadate 0.5 mol/L Tris, PH=7,4) with protease inhibitors. Protein were separated in 12% denaturing sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose sheets (Hybond ECL, Amersham, Orsay, France). Anti-body against ICAM1 (1/500, abcam) VCAM1 (1/200, abcam) were used for immunoblotting. As a protein loading control, membranes were stripped, incubated with a goat polyclonal antibody directed against total actin (dilution 1/1000, Santa cruz Biotechnology). After washing three times, blots were incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Santa cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature and developed using ECL system (GE Health-care) following standard procedures. Quantification of immunoblot bands was performed on digitized images using Image-Quant software. ICAM-1 and VCAM-1 protein expression in different conditions and time point is expressed as mean ± SD. Non-irradiated HUVEC were set as 100%. For each time point intergroup comparison are made using a one-way ANOVA and Student t-test.

Enzyme-linked immunosorbent assay for IL-6, MCP-1 and TNF-α

After the cells were thawed the cells were grown for three days and the medium was collected from the different conditions.

The IL-6, MCP-1 and TNF-α concentration in samples of conditioned medium was measured by means of a Human IL-6, MCP-1 and TNF-α immunoassay. For cell culture supernatants, a sensitivity of 5 pg/mL could be achieved. IL-6, MCP-1 and TNF-α concentration in different conditions and time point are expressed as mean ± SD. The cytokines concentrations in the

medium of non-irradiated HUVEC were set as 100%. For each time point intergroup comparison are made using a one-way ANOVA and Student t-test.

Real time PCR

Total RNA from HUVECs was extracted using TRI Reagent solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). RNA quality was checked by measuring the ratio of optical densities at 260 and 280 nm.

Real-time PCR was used to analyse the mRNA levels of E-selectin after 1, 3, 6 and 10 weeks of irradiation.

Real-time PCR was performed with an Abi Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using SYBR Green (Applied Biosystems). All samples were normalized to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to analyse the results **(37)**. Sequences for the forward and reverse primers are ATGCAGCGCACAAGGGCAGT and CCCGTGGCACCACACGTCA.

E-Selectin gene expression in different conditions and time point is expressed as mean ± SD. Non-irradiated HUVECs were set as 1. For each time point intergroup comparison are made using a one-way ANOVA and Student t-test.

Vascular network formation: Matrigel

The function of HUVECs after irradiation was assessed by measuring their capacity to form vascular networks on matrigel. Matrigel is a gelatinous protein mixture which is introduced on culture plates. HUVECs create intricate spiderweb-like networks in matrigel coated surface. Such networks are highly suggestive of the vascular capillary systems. 3 days after thawing the samples of HUVECs cells, irradiated under different dose rate, cells were harvested and 100 000 cells per well were dispatched in different culture dishes with Matrigel. The quantification of network formation was measured in terms of the number of

branches per site. Ten different sites per condition were counted. The number of branch per site in different conditions and time point is expressed as mean ± SD. Non-irradiated HUVEC were set as 100%. For each time point intergroup comparison are made using a one-way ANOVA and Student t-test.

Statistical analysis

All values are means ± SD. Statistical analysis for the *in vitro* experiments were performed using Anova test and Student t-test. A probability value of $p \leq 0,05$ was set for considering differences to be statistically significant.

Results

ICAM-1 and VCAM-1 expression is unchanged in any conditions

We evaluated protein expression levels of the cell surface proteins ICAM-1 and VCAM-1 after exposure to low-dose rate gamma irradiation for different period of time (Fig. 1).

Expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 were unchanged for all time points and for all dose rates investigated.

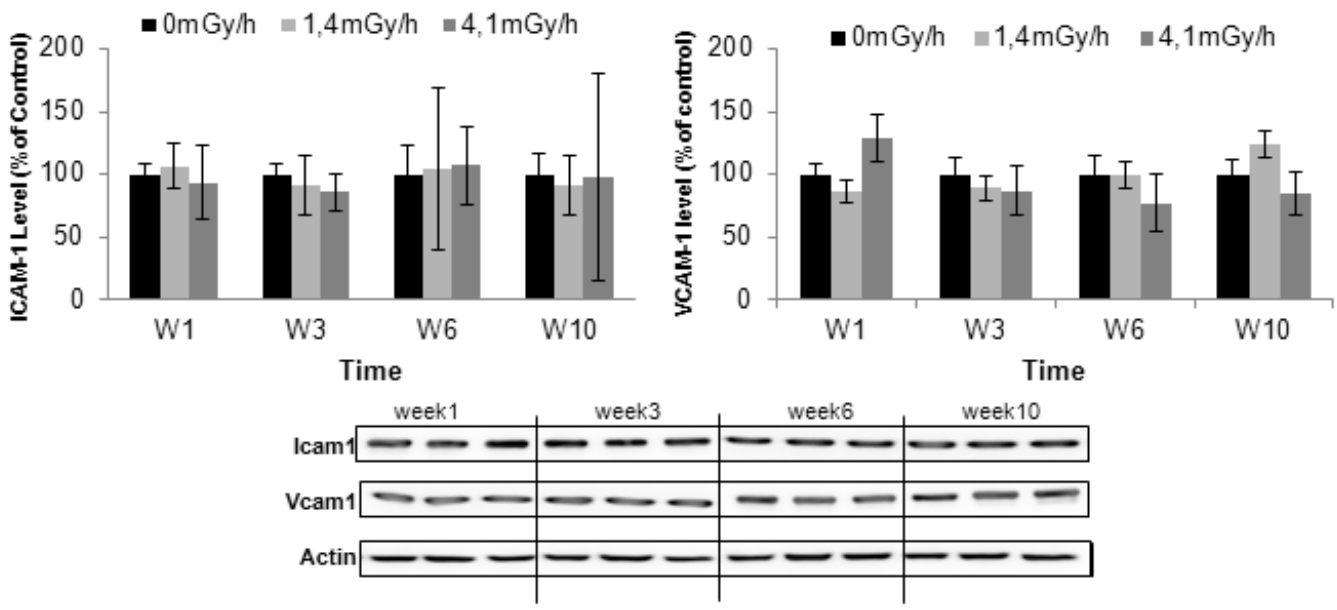


Figure 1: Representative western blot and quantitative evaluation of ICAM1 and VCAM1 protein level in HUVECs irradiated with 1,4mGy/h and 4,1mGy/h during 1, 3, 6 and 10 weeks. Values are mean ± SD, n=3 per group. *P<0.05 versus untreated HUVECs

E-selectin is transitory up-regulated after 3 weeks chronic irradiation with 4.1 mGy/h

We also determined E-selectin mRNA level. We observed a significant increase in E-selectin at 6 weeks after 4.1mGy/h irradiation compared to non-irradiated cells or irradiated with 1.4mGy/h (1.4 and 1.75 fold respectively) (Fig. 2). After 10 weeks of irradiation we did not observe any difference in E-selectin expression in any groups.

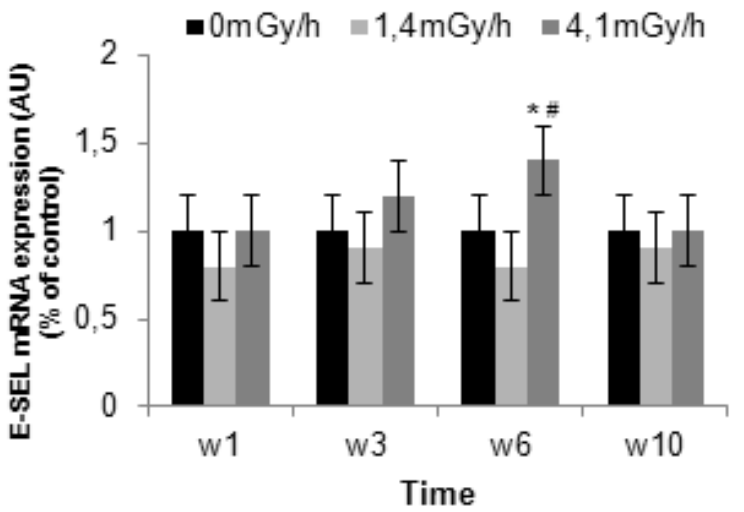


Figure 2: The gene expression of E-selectin was measured in HUVECs irradiated with 1.4mG/h and 4.1mGy/h during 1, 3, 6 and 10 weeks. Values are mean ± SD, n=3 per group. *P<0.05; **P<0.01 versus untreated HUVECs. #P<0.05; ##P<0.01 versus HUVEC irradiated with 1.4mGy/h.

MCP-1 and IL-6 are up-regulated in a dose-rate dependant manner

We quantified cytokine release in the supernatant of irradiated HUVECs at different conditions. TNF-α expression is increased significantly when the dose reached to 6.9 Gy after 10 weeks exposure to 4.1 mGy/h compared to non-irradiated HUVECs or HUVECs irradiated with 1.4 mGy/h (2 fold and 3.9 fold respectively) (Fig. 3A).

IL-6 expression is increased in a dose-rate dependant manner. Indeed, IL-6 expression in the medium of HUVEC, when the cumulative dose reached to 2 Gy after 3 weeks exposure to 4.1 mGy/h, is significantly increased compared to non-irradiated HUVECs or HUVECs exposed to 1.4mGy/h during 3 weeks (2 fold and 2.05 fold respectively). Whereas at the same dose of 2 Gy after 10 weeks exposure to 1.4 mGy/h we did not observe any significant increase in IL-6 exposure compared to non-irradiated HUVEC at the same time point. After 6 weeks, IL-6 release in the medium is unchanged in any condition. But 10 weeks exposure to 4.1mGy/h increase significantly the release of IL-6 in the medium compared to non-exposed HUVECs (2 folds) (Fig. 3B).

Similarly, MCP-1 expression is increased in a dose-rate dependant manner. MCP-1 expression in the medium of HUVECs, when the cumulative dose reached to 2 Gy after 3 weeks exposure to 4.1 mGy/h, is significantly increased compared to non-irradiated HUVECs or HUVECs exposed to 1.4 mGy/h during 3 weeks (1.82 and 1.77 fold respectively). Whereas at the same dose of 2 Gy after 10 weeks exposure to 1.4mGy/h we did not observe any significant increase in MCP-1 exposure compared to non-irradiated HUVECs at the same time point. MCP-1 is not increased in a dose dependant manner because we did not observe any difference in MCP-1 release after 6 or 10 weeks in any condition (Fig. 3C).

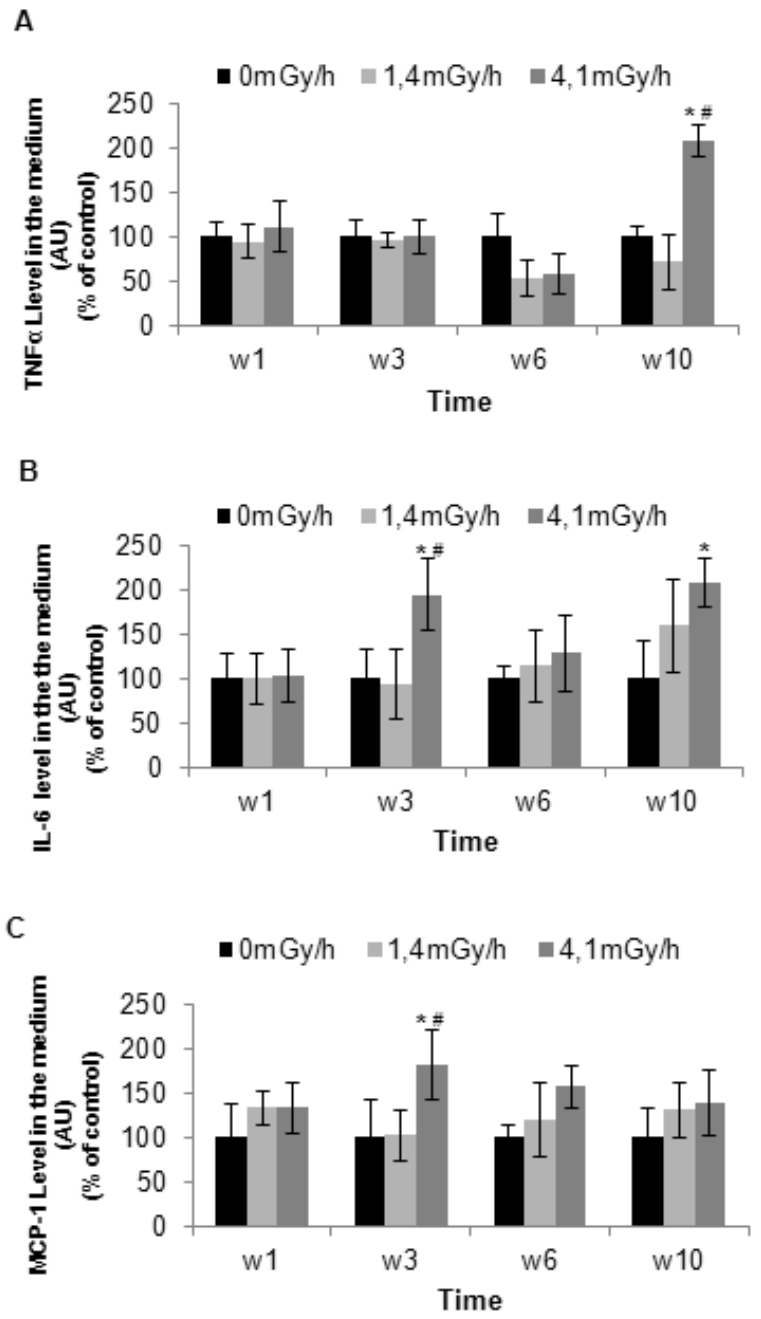


Figure 3: Cytokine release (TNFα, IL6 and MCP1) in the medium of HUVECs irradiated with 1.4mGy/h and 4.1mGy/h during 1, 3, 6 and 10 weeks was measured with enzyme linked immunosorbent assay kits 3 days after HUVEC thawing in different conditions. Values are mean ± SD, n=3 per group. *P<0.05; **P<0.01 versus untreated HUVEC. #P<0.05; ##P<0.01 versus HUVEC irradiated with 1.4mGy/h.

Reduction in HUVECs capacity to form vascular networks is dose-rate dependent

To investigate if the increase in pro-inflammatory molecules induced by low dose chronic irradiation affected HUVECs function, we evaluated their capacity to form vascular networks in matrigel.

The results show a dose-rate dependency. Indeed, the number of branch per site when the cumulative dose reached to 2 Gy after 3 weeks exposure to 4.1 mGy/h, is significantly decreased compared to non-irradiated HUVECs (1.55 fold). Whereas at the same dose of 2 Gy after 10 weeks exposure to 1.4 mGy/h we did not observe any significant decrease in the number of HUVECs branching in exposed cells compared to non-irradiated HUVECs at the same time point.

The decrease in HUVECs function is also dose-dependent with the highest dose-rate because more the cumulative dose is increased more the number of branch per site is decreased. We observed a significant decrease in the number of branch per site in HUVECs irradiated during 6 or 10 weeks compared to non-exposed HUVECs at 6 or 10 weeks respectively (1.5 and 5 fold respectively) (Fig. 4).

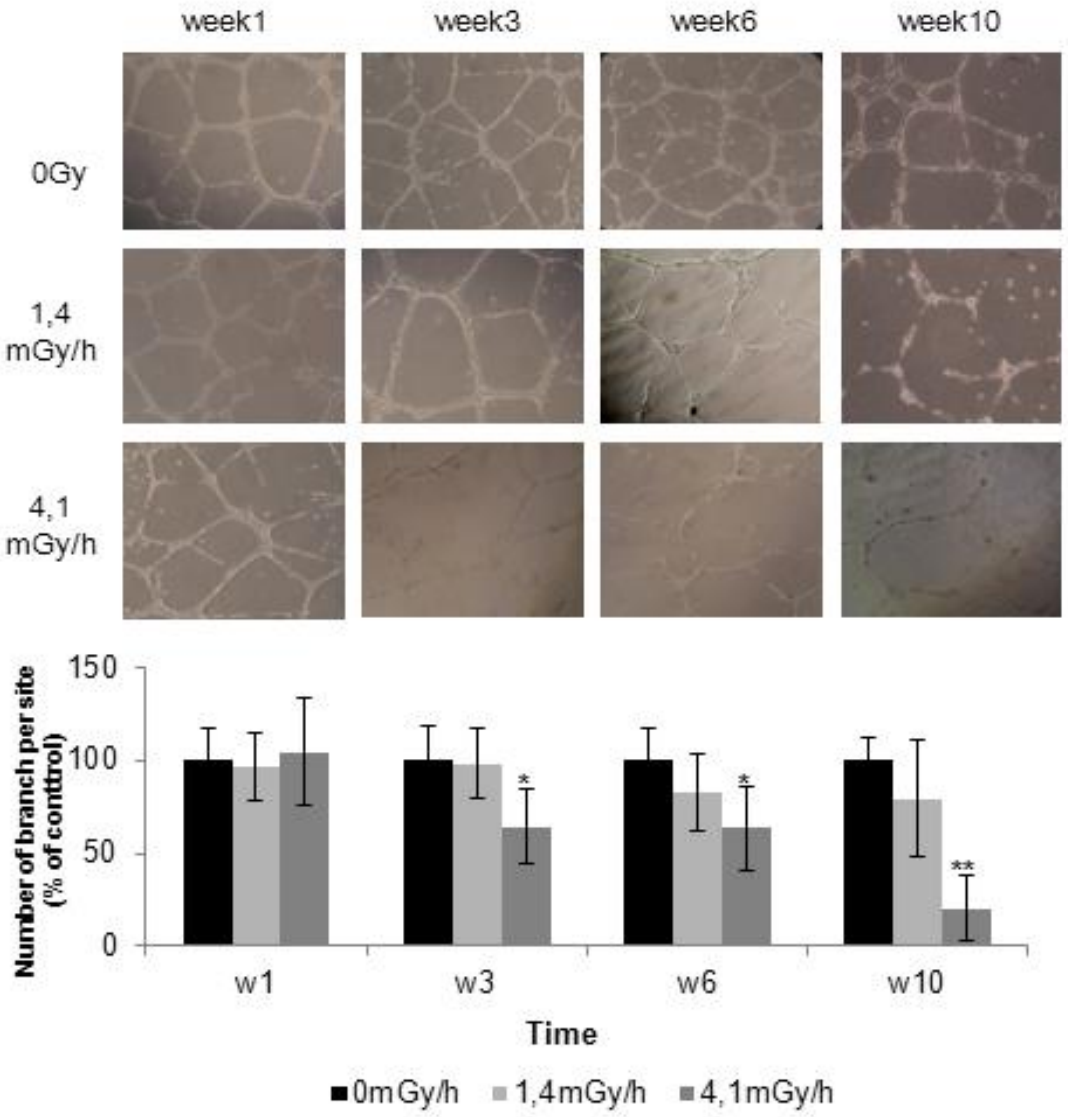


Figure 4: Functionality of HUVECs was measured by their capacity to form vascular network on matrigel. The same number of cells were dispatched in different culture dishes with matrigel. The number of branch per site and 10 sites per condition were counted. Data are presented as mean ± SD, n=3 per group. *P<0.05; **P<0.01 and ***P<0.01 versus untreated HUVECs

Discussion

In this study, to the best of our knowledge, we show for the first time that chronic low-dose rate ionizing radiation triggers a loss of function of primary HUVECs in a dose-rate and dose dependant manner. The cells showed a loss of their angiogenic ability when the cumulative dose from the chronic exposure to 4.1 mGy/h reached 2 Gy. Exposure to 1.4 mGy/h did not significantly change the ability to form vascular tubular network, even for the 10 week time point when the accumulated dose had reached 2.3 Gy. The dose rate dependent loss of ability to from vascular network is correlated with the increase in IL-6 and MCP-1 release. This results show the importance of the dose-rate after low dose exposure and the presence of a threshold after low dose exposure which is 2 Gy in our study.

Expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 were unchanged for all time points and for both dose rates. The absence of effect on the expression of ICAM-1 and VCAM-1 could be related to the sampling time. Indeed *Hallahan et al* **(38)** found an increase in ICAM-1 already 24 h after an acute irradiation and *Gaugler et al* **(24)** found an increase after 48 h. The low dose rate of chronic exposures used in this study could hypothetically trigger alternative response pathways such as adaptive responses causing up regulation of anti-inflammatory processes.

During endothelial cell inflammatory processes other adhesion molecules such as E-selectin are up regulated, to promote adhesion of pro inflammatory cells such as macrophages on the surface of the endothelium. We observed a significant increase in E-selectin after 6 weeks with high dose-rate irradiation. This result is in agreement with some reports showing an increase in E-selectin expression on HUVECs after 0.5 Gy exposure **(39; 40)**. In contrast, *Gaugler et al*, did not observe any increase of E-selectin expression in HUVECs, after 2 days of irradiation. Furthermore, E-selectin is involved in the development and progression of atherosclerosis and a recent study by *Mitchel et al* **(6)** have shown the importance of the dose-rate of irradiation on the late stages of atherosclerosis.

The up regulation of adhesion molecules on HUVECs is often mediated by cytokines present or released at the inflammatory site. To determine if low dose irradiation affects cytokine release we evaluated pro-inflammatory cytokine levels in the supernatant of HUVECs

exposed to different irradiation dose-rates at different time points. We found an increase of MCP-1 and IL-6 with high dose-rate that was maintained over time at 6 and 10 weeks after irradiation. Soluble inflammatory mediators (cytokines, chemokines) could act in a paracrine manner to further activate receptors on the surface of the endothelium. Inflammatory mediators such as IL-6, TNF-α and MCP-1 have been shown to be released following irradiation **(41; 42)** and to activate ECs. The local response of ECs to the injury results in the release into the systemic circulation of pro inflammatory factors contributing to systemic dysfunction and/or activation of ECs in organs distant to the original insult. The increase in MCP-1 release suggests an increase of the inflammatory process specifically by recruitment of macrophages, since MCP-1 is the major chemo attractant of macrophages. There is contradictory data regarding the influence of IL-6 on the adhesion process of endothelial cells. *Podor et al* **(43)** examined the production of IL-6 in HUVECs stimulated by TNF-α and in their experiments IL-6 expression had no detectable influence on several EC functions.

On the other hand, *Watson et al* **(44)**, reported that treatment of HUVECs with IL-6 increased the yields of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1. Our results suggest a dose rate dependent increase in inflammatory cytokines after low doses. This result is in line with the recent study by *Mitchel et al* **(6)** on the increase in atherosclerosis progression after exposure to high compared to low dose rate in an *in vivo* model. Moreover it was shown that irradiation-induced senescence-associated secretory phenotype results in the expression of many important inflammatory cytokines such as IFNγ, TGFβ, and several interleukins, chemokines, and other secretory proteins showed increased expression in the irradiated cells **(45; 46)**.

To determine if the increase in cytokine release with high dose rate could influence EC function we investigated their capacity to form vascular networks in matrigel that is an index of their angiogenic function.

The results showed that after 3 weeks of high dose rate irradiation, the number of branches per site was decreased compared to non-irradiated cells. This effect is dose-rate dependent because no significant decrease was observed on HUVECs irradiated at the same dose but with low dose-rate. There was an inverse relation between the dose rate and the number of branches per site. A few reports have shown that the rate of capillary growth declined in

endothelial cells *in vitro* because of increased IL-1α **(47)** or TNF-α **(48)**. *Donneys et al* **(49)** have shown recently that acute irradiation with low doses increases cellular movement and organization whereas with high doses ECs form fewer tubules in culture. In their study time lapse recording demonstrated a considerable increase in cellular organisation, activity and locomotion in response to this low–dose of therapy. They have also shown that the time to peak angiogenesis and consolidation were significantly reduced with high-dose of irradiation. Furthermore *Yentrapalli et al* have shown recently that with a dose of 4.1 mGy/h, HUVECs enter into senescence, which is a cause of vascular alteration. Moreover a recent report has shown a correlation between acute exposure to 2 or 4 Gy, and loss of endothelial cell tube length in the matrigel and increase in inflammatory cytokines **(50)**. During endothelial cell loss, it is well known that inflammation participates to restore and increase the angiogenic process **(46)**. In our *in-vitro* model, the loss of tubular network is correlated with an increase of cytokines but we suppose that the time lapse is insufficient to restore tubular network *in-vitro*.

The present study shows for the first time that chronic ionising radiation decrease HUVECs angiogenic function in terms of capacity to form vascular networks in matrigel. This is correlated with an increase in IL-6 and MCP-1 release with high dose-rate irradiation. In contrast chronic irradiation does not affect expression of ICAM-1 and VCAM-1 on the surface of HUVECs. The same dose given with high dose-rate could have a detrimental effect on cells whereas with low dose-rate no any detrimental effect was observed. This study shows the importance of the dose-rate during exposure to ionizing radiation even in low-dose range.

This study could be completed by investigating other HUVEC function such as adhesion to inflammatory cells and migration.

Acknowledgements :

The authors acknowledge financial support of DoReMi and Fatoumata Sokhona for technical assistance.

References

1. Azizova TV, Muirhead CR, Druzhinina MB, Grigoryeva ES, Vlasenko EV, Sumina MV, et al. Cerebrovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948-1958. Radiation research. 2010;174(6):851-64. Epub 2010/12/07.

2. Azizova TV, Muirhead CR, Druzhinina MB, Grigoryeva ES, Vlasenko EV, Sumina MV, et al. Cardiovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948-1958. Radiation research. 2010;174(2):155-68. Epub 2010/08/05.

3. Stewart FA, Hoving S, Russell NS. Vascular damage as an underlying mechanism of cardiac and cerebral toxicity in irradiated cancer patients. Radiation research. 2010;174(6):865-9. Epub 2010/12/07.

4. Schultz-Hector S, Trott KR. Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data? International journal of radiation oncology, biology, physics. 2007;67(1):10-8. Epub 2006/12/26.

5. Little MP, Tawn EJ, Tzoulaki I, Wakeford R, Hildebrandt G, Paris F, et al. A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms. Radiation research. 2008;169(1):99-109. Epub 2007/12/28.

6. Mitchel RE, Hasu M, Bugden M, Wyatt H, Little MP, Gola A, et al. Low-dose radiation exposure and atherosclerosis in ApoE(-)/(-) mice. Radiation research. 2011;175(5):665-76. Epub 2011/03/08.

7. Gaugler MH, Squiban C, Mouthon MA, Gourmelon P, van der Meeren A. Irradiation enhances the support of haemopoietic cell transmigration, proliferation and differentiation by endothelial cells. British journal of haematology. 2001;113(4):940-50. Epub 2001/07/10.

8. Bilato C, Crow MT. Atherosclerosis and the vascular biology of aging. Aging (Milano). 1996;8(4):221-34. Epub 1996/08/01.

9. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. The New England journal of medicine. 2005;352(16):1685-95. Epub 2005/04/22.

10. Herrera MD, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update. Ageing research reviews. 2010;9(2):142-52. Epub 2009/07/22.

11. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. Circulation. 2002;105(13):1541-4. Epub 2002/04/03.

12. Merat S, Fruebis J, Sutphin M, Silvestre M, Reaven PD. Effect of aging on aortic expression of the vascular cell adhesion molecule-1 and atherosclerosis in murine models of atherosclerosis. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences. 2000;55(2):B85-94. Epub 2000/03/29.

13. Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albini A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. Cancer metastasis reviews. 2008;27(1):31-40. Epub 2007/12/19.

14. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. Mutation research. 2008;659(1-2):15-30. Epub 2008/05/20.

15. Young EF, Smilenov LB. Impedance-based surveillance of transient permeability changes in coronary endothelial monolayers after exposure to ionizing radiation. Radiation research. 2011;176(4):415-24. Epub 2011/08/25.

16. Fauquette W, Amourette C, Dehouck MP, Diserbo M. Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study. Brain research. 2012;1433:114-26. Epub 2011/12/14.

17. Gabrys D, Greco O, Patel G, Prise KM, Tozer GM, Kanthou C. Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2007;69(5):1553-62. Epub 2007/10/09.

18. Kapitonova MY, Muid S, Froemming GR, Yusoff WN, Othman S, Ali AM, et al. Real space flight travel is associated with ultrastructural changes, cytoskeletal disruption and premature senescence of HUVEC. The Malaysian journal of pathology. 2012;34(2):103-13. Epub 2013/02/22.

19. Park MT, Oh ET, Song MJ, Lee H, Park HJ. Radio-sensitivities and angiogenic signaling pathways of irradiated normal endothelial cells derived from diverse human organs. Journal of radiation research. 2012;53(4):570-80. Epub 2012/07/31.

20. Ungvari Z, Podlutsky A, Sosnowska D, Tucsek Z, Toth P, Deak F, et al. Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebromicrovascular endothelial cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular radiosensitivity. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences. 2013;68(12):1443-57. Epub 2013/05/22.

21. Igarashi K, Miura M. Inhibition of a radiation-induced senescence-like phenotype: a possible mechanism for potentially lethal damage repair in vascular endothelial cells. Radiation research. 2008;170(4):534-9. Epub 2008/11/26.

22. Yentrapalli R, Azimzadeh O, Sriharshan A, Malinowsky K, Merl J, Wojcik A, et al. The PI3K/Akt/mTOR Pathway Is Implicated in the Premature Senescence of Primary Human Endothelial Cells Exposed to Chronic Radiation. PloS one. 2013;8(8):e70024. Epub 2013/08/13.

23. Panes J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. The American journal of physiology. 1995;269(6 Pt 2):H1955-64. Epub 1995/12/01.

24. Gaugler MH, Squiban C, van der Meeren A, Bertho JM, Vandamme M, Mouthon MA. Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. International journal of radiation biology. 1997;72(2):201-9. Epub 1997/08/01.

25. Langley RE, Bump EA, Quartuccio SG, Medeiros D, Braunhut SJ. Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells. British journal of cancer. 1997;75(5):666-72. Epub 1997/01/01.

26. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. Science. 2001;293(5528):293-7. Epub 2001/07/14.

27. Milliat F, Francois A, Tamarat R, Benderitter M. [Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]. Annales de cardiologie et d'angeiologie. 2008;57(3):139-48. Epub 2008/06/27. Role de l'endothelium dans les dommages radio-induits aux tissus sains.

28. Albelda SM. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. American journal of respiratory cell and molecular biology. 1991;4(3):195-203. Epub 1991/03/01.

29. Schimmenti LA, Yan HC, Madri JA, Albelda SM. Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, modulates cell migration. Journal of cellular physiology. 1992;153(2):417-28. Epub 1992/11/01.

30. Tyurina YY, Tyurin VA, Kapralova VI, Wasserloos K, Mosher M, Epperly MW, et al. Oxidative lipidomics of gamma-radiation-induced lung injury: mass spectrometric characterization of cardiolipin and phosphatidylserine peroxidation. Radiation research. 2011;175(5):610-21. Epub 2011/02/23.

31. Holler V, Buard V, Gaugler MH, Guipaud O, Baudelin C, Sache A, et al. Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. The Journal of investigative dermatology. 2009;129(5):1280-91. Epub 2009/02/13.

32. Quarmby S, Kumar P, Kumar S. Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. International journal of cancer Journal international du cancer. 1999;82(3):385-95. Epub 1999/07/10.

33. Quarmby S, Hunter RD, Kumar S. Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells. Anticancer research. 2000;20(5B):3375-81. Epub 2000/12/29.

34. Rafat M, Rotenstein LS, Hu JL, Auguste DT. Engineered endothelial cell adhesion via VCAM1 and E-selectin antibody-presenting alginate hydrogels. Acta biomaterialia. 2012;8(7):2697-703. Epub 2012/04/17.

35. Yentrapalli R, Azimzadeh O, Barjaktarovic Z, Sarioglu H, Wojcik A, Harms-Ringdahl M, et al. Quantitative proteomic analysis reveals induction of premature senescence in human umbilical vein endothelial cells exposed to chronic low-dose rate gamma radiation. Proteomics. 2013;13(7):1096-107. Epub 2013/01/26.

36. Rombouts C, Aerts A, Beck M, De Vos WH, Van Oostveldt P, Benotmane MA, et al. Differential response to acute low dose radiation in primary and immortalized endothelial cells. International journal of radiation biology. 2013. Epub 2013/05/23.

37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8. Epub 2002/02/16.

38. Hallahan D, Kuchibhotla J, Wyble C. Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. Cancer research. 1996;56(22):5150-5. Epub 1996/11/15.

39. Hallahan D, Clark ET, Kuchibhotla J, Gewertz BL, Collins T. E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction. Biochemical and biophysical research communications. 1995;217(3):784-95. Epub 1995/12/26.

40. Hallahan DE, Kuchibhotla J, Wyble C. Sialyl Lewis X mimetics attenuate E-selectin-mediated adhesion of leukocytes to irradiated human endothelial cells. Radiation research. 1997;147(1):41-7. Epub 1997/01/01.

41. Girinsky TA, Pallardy M, Comoy E, Benassi T, Roger R, Ganem G, et al. Peripheral blood corticotropin-releasing factor, adrenocorticotropic hormone and cytokine (interleukin beta, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha) levels after high- and low-dose total-body irradiation in humans. Radiation research. 1994;139(3):360-3. Epub 1994/09/01.

42. Fedorocko P, Egyed A, Vacek A. Irradiation induces increased production of haemopoietic and proinflammatory cytokines in the mouse lung. International journal of radiation biology. 2002;78(4):305-13. Epub 2002/05/22.

43. Podor TJ, Jirik FR, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6. Annals of the New York Academy of Sciences. 1989;557:374-85; discussion 86-7. Epub 1989/01/01.

44. Watson C, Whittaker S, Smith N, Vora AJ, Dumonde DC, Brown KA. IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. Clinical and experimental immunology. 1996;105(1):112-9. Epub 1996/07/01.

45. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beausejour CM, Parrinello S, et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. PloS one. 2010;5(2):e9188. Epub 2010/02/20.

46. Kim YW, West XZ, Byzova TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. J Mol Med (Berl). 2013;91(3):323-8. Epub 2013/02/23.

47. Maier P, Veldwijk MR, Wenz F. Radioprotective gene therapy. Expert opinion on biological therapy. 2011;11(9):1135-51. Epub 2011/05/03.

48. Shimada Y, Ito H, Kaji K, Fukuda M. Tumor necrosis factor reduces lifespan of human endothelial cells in vitro. Mechanisms of ageing and development. 1990;55(3):245-54. Epub 1990/09/01.

49. Donneys A, Weiss DM, Deshpande SS, Ahsan S, Tchanque-Fossuo CN, Sarhaddi D, et al. Localized deferoxamine injection augments vascularity and improves bony union in pathologic fracture healing after radiotherapy. Bone. 2013;52(1):318-25. Epub 2012/10/23.

50. Kim KS, Kim JE, Choi KJ, Bae S, Kim DH. Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells. International journal of radiation biology. 2014;90(1):71-80. Epub 2013/10/30.

II – ETUDE PRÉLIMINAIRE D'EXPOSITION *IN VITRO* – MODELE HAOSMC

Suites aux expérimentations de contamination interne « *vivo* » pendant 3 mois, un résultat majeur a été l'observation d'un épaississement de la paroi aortique chez les ApoE$^{-/-}$ exposées à la plus forte concentration de 100 kBq.L^{-1}. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour tenter d'expliquer ce résultat. Notamment celles qu'une exposition à faible dose de rayonnement ionisant pourrait induire une stimulation de la production de collagène au niveau aortique, une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses, entraînant une augmentation de l'épaisseur aortique.

C'est pourquoi afin de tenter d'expliquer ce phénomène de remodelage vasculaire précoce et d'avoir une approche plus fine au niveau cellulaire, nous avons utilisé des cellules musculaires lisses aortiques que nous avons exposées à du césium 137 *via* le milieu de culture pendant 72h, afin de « reproduire » *in vitro* une gamme de concentrations croissantes.

Ces résultats sont tout à fait préliminaires, et demanderont bien sûr à être complétés.

1. « Prolifération » - expression génique de PCNA

L'étude de l'expression génique de PCNA[20] ne permet pas de mettre en évidence de différence d'expression entre les différents groupes étudiés (**figure 36**). Il semblerait donc qu'une exposition au césium 137 via le milieu de culture n'interfère pas sur ce paramètre. Il s'agirait bien évidemment de compléter ce résultat en réalisant d'autres tests, comme la mesure de la LDH dans les surnageants cellulaires.

[20] PCNA = Proliferating cell nuclear antign

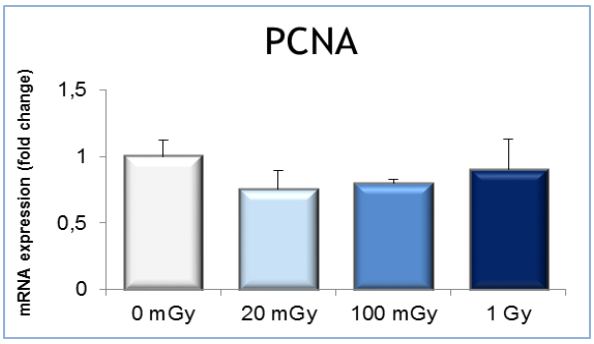


Figure 36 Expression génique de PCNA des HAoSMC après une exposition de 72h au césium 137 *via* le milieu de culture

2. Profil inflammatoire

La mesure de l'expression génique par PCR de deux cytokines pro-inflammatoires que sont MCP-1 et ICAM-1 révèle que leur niveau d'expression est augmenté significativement comparé au groupe de cellules non-exposé, dans les groupes 100 mGy et 1 Gy pour MCP-1, et 20 mGy et 100 mGy pour ICAM-1 (**figure 37**).

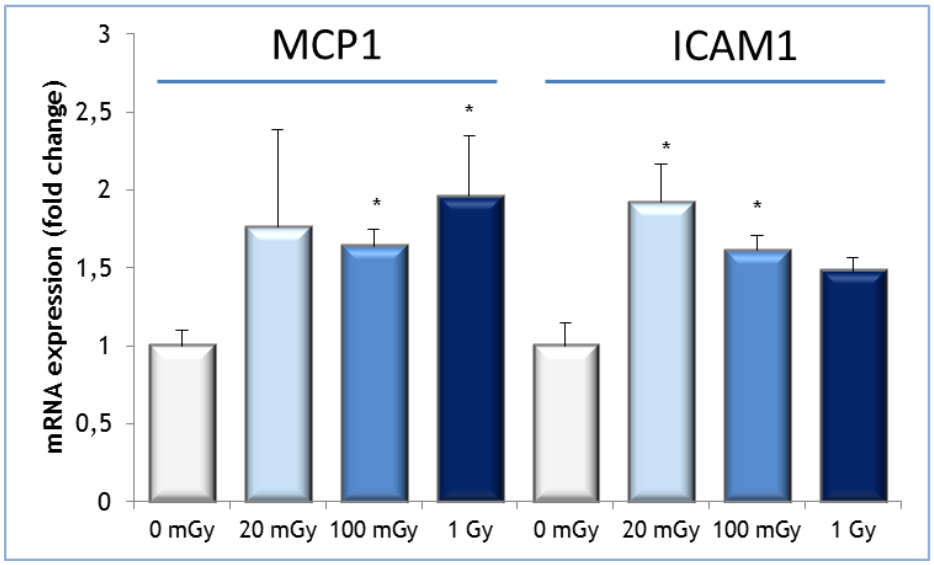


Figure 37 Expression génique de MCP-1 et ICAM-1 sur les HAoSMC après une exposition de 72h au césium 137 *via* le milieu de culture (* : p < 0,05)

De façon intéressante, lorsque l'on mesure dans le milieu de culture les niveaux de MCP-1 et d'IL-6, on observe également une augmentation significative de la concentration de MCP-1 à 1 Gy comparé au groupe non-exposé. Pour IL-6, la concentration retrouvée dans le milieu est significativement augmentée dès 20 mGy comparé au groupe témoin (**figure 38**).

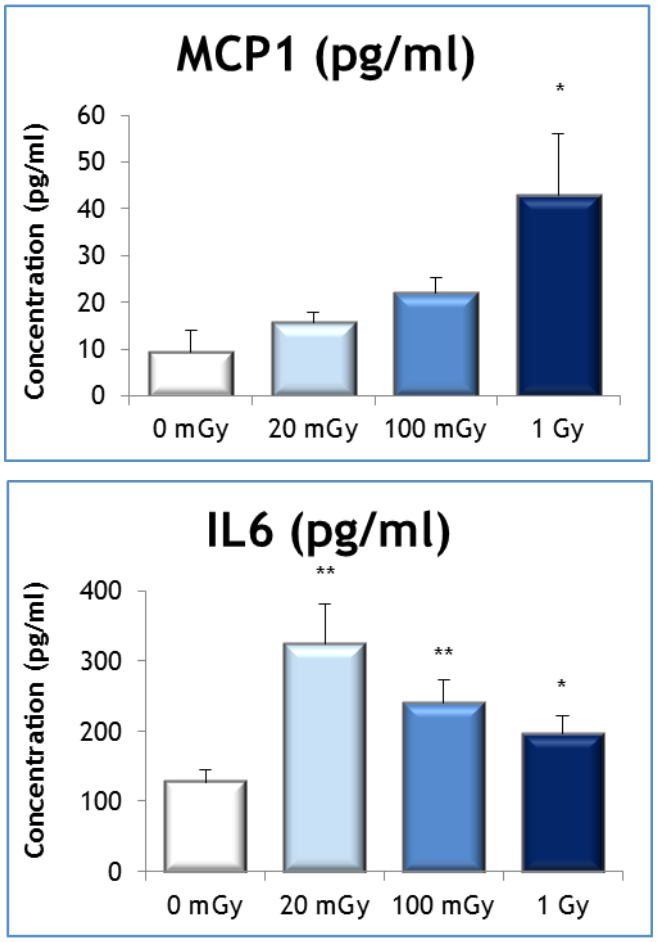


Figure 37 Concentration (en pg/mL) de MCP-1 et IL-6 dans les surnageants de culture des HAoSMC après une exposition de 72h au césium 137 (* : p <0,05 ; ** : p < 0,01)

Ce résultat est à rapprocher de celui en cas d'irradiation chronique pendant 3 semaines des cellules HUVECs (au débit de dose 4.1 mGy/h) et lorsque la dose atteint 2 Gy.

3. Expression génique collagènes / MMP

L'étude de l'expression génique des collagènes 1 et 3 par les HAoSMC après exposition de 72 heures au césium 137 *via* le milieu de culture entraîne une baisse de leurs expressions dans le groupe 20 mGy comparé au groupe témoin. Les niveaux d'expressions pour les doses plus élevées ne sont en revanche pas modifiés (**figure 39**).

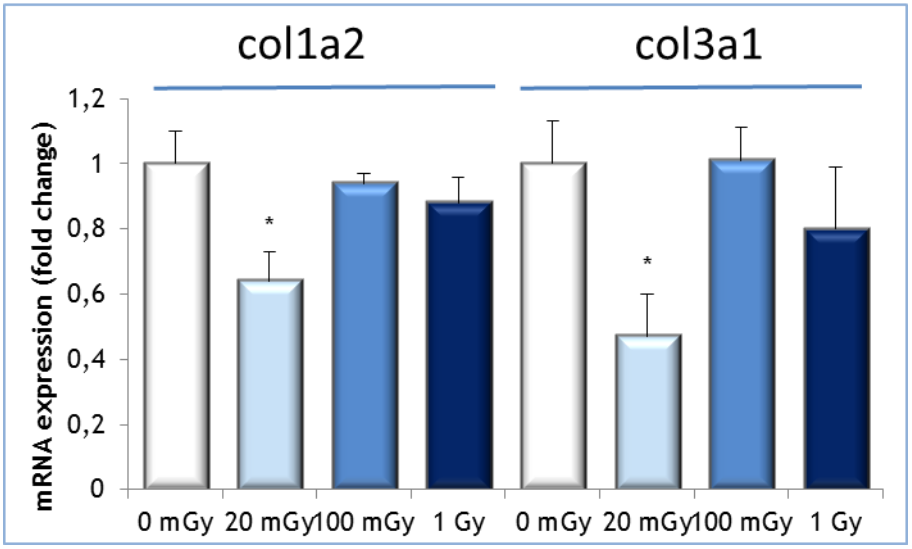


Figure 38 Expression génique des collagènes 1 et 3 par les HAoSMC après une exposition de 72h au césium 137 (* : p <0,05)

En revanche, lorsque l'on s'intéresse à l'expression génique des MMP-1 et MMP-2 dans ces mêmes conditions expérimentales, le niveau d'expression de ces MMP est significativement augmenté dans les groupes de cellules contaminées (**figure 40**).

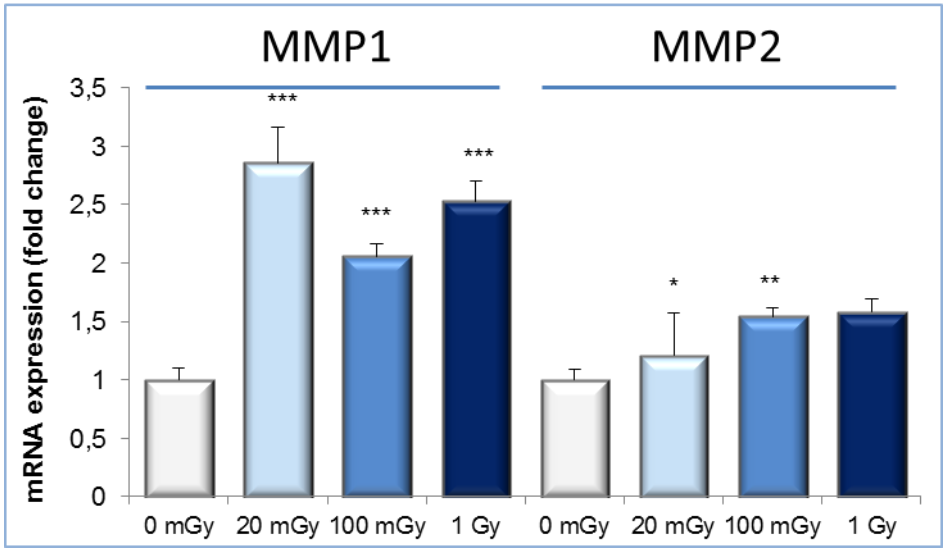


Figure 39 Expression génique des MMP-1 et -2 par les HAoSMC après une exposition de 72h au césium 137 (* : p <0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** p < 0,001)

Aux vues de ces premiers résultats, une exposition au césium 137 *via* le milieu de culture des HAoSMC induit des modifications de l'expression de gènes de protéines impliquées dans la progression de l'athérosclérose, ainsi qu'une augmentation des niveaux de cytokines inflammatoires relarguées dans le milieu de culture. Une telle exposition génèrerait un microenvironnment inflammatoire. La question est de savoir si de tels effets observés *in vitro* peuvent être intégrés dans un contexte plus « intégré ».

D'importants paramètres restent encore à évoluer : la viabilité et la prolifération cellulaire (test LDH, ou MTT par exemple).

La fonctionnalité ces HAoSMC pourrait également être évalué en réalisant un test « wound healing », qui créer une blessure sur le tapis cellulaire formé, et ainsi permet de suivre la capacité des cellules à venir combler la brèche.

Dans ce même ordre d'idée, pour explorer plus finement les effets générés par une telle exposition, il existe dans le commerce des kits permettant d'étudier les voies de signalisation activées. Par exemple, la voie des MAPK, impliquée dans les phénomènes de prolifération cellulaire, suite à une activation cytokinique.

Discussion générale
&
Perspectives

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Un réel questionnement sociétal subsiste quant aux effets engendrés par une exposition à long terme à de faibles doses de rayonnement ionisant sur la santé de l'homme.

Mon travail de thèse, qui s'inscrit dans le programme de recherche ENVIRHOM de l'IRSN, lancé en 2001, est le premier à mettre en évidence les effets induits par une exposition interne chronique à de faibles doses de rayonnement ionisant sur la progression de la pathologie athéromateuse.

Des animaux prédisposés (souris ApoE$^{-/-}$) à la pathologie ont été exposés à différentes concentrations de césium 137, comparables à celles retrouvées en territoires contaminés autour de Tchernobyl **(Handl, et al. 2003)** à différents temps afin de suivre la progression de la maladie.

Les résultats obtenus *in vivo* aux différents temps d'expérimentation soulignent que la progression des effets sous-jacents à une contamination chronique au césium 137 n'est pas linéaire.

Une exposition interne chronique à faible dose de ^{137}Cs n'altère pas les paramètres généraux des souris prédisposées

Les paramètres généraux de prise alimentaire, de consommation hydrique et de gain de poids, mesurés de façon hebdomadaire ne diffèrent pas entre les groupes contaminés ou non quel que soit le temps d'exposition au ^{137}Cs.

Ce résultat avait déjà été montré précédemment dans plusieurs études expérimentales d'exposition chronique au ^{137}Cs **(Souidi, et al. 2006; Tissandie, et al. 2009)**.

Une exposition interne chronique à faible dose de ^{137}Cs ne modifie pas les paramètres biochimiques plasmatiques

Bien qu'une perturbation du profil lipidique, et en particulier l'apparition d'une hypercholestérolémie, ait été rapportée chez les Liquidateurs de Tchernobyl, soumis à une irradiation externe à forte dose lors du nettoyage de la zone sinistrée **(Chaialo, et al. 1991)**, dans notre étude expérimentale, la caractérisation du profil lipidique des souris ApoE$^{-/-}$ au cours du temps ne permet pas de mettre en évidence des modifications des niveaux plasmatiques de HDL, LDL et cholestérol entre les animaux exposés ou non.

Effets différentiels d'une exposition interne chronique à faible doses de ^{137}Cs sur la progression de la pathologie athéromateuse : mécanismes « adaptatifs » ?

Les mécanismes par lesquels les rayonnements ionisants induisent des dommages sur l'organisme, et particulièrement des effets au niveau cardiaque, en favorisant l'athérosclérose (à fortes doses), ne sont pas encore élucidés.

Classiquement, les effets induits sur le système vasculaire suivant une exposition à des rayonnements ionisants supérieurs à 1-2 Sv incluent des modifications inflammatoires, un stress oxydant, des altérations de la coagulation ainsi qu'une instabilité génétique **(Little, et al. 2008; Schultz-Hector and Trott 2007)** (**figure 41**).

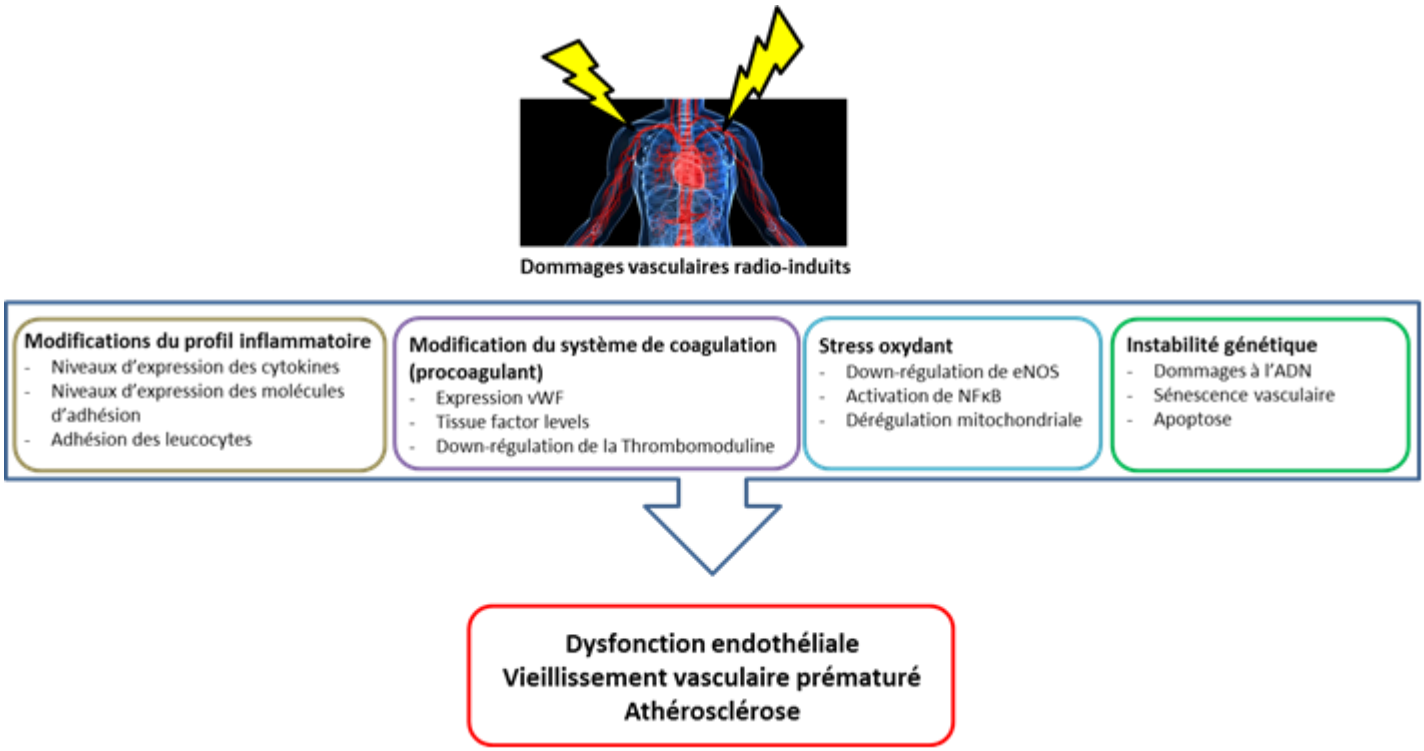


Figure 40 Altérations biologiques et moléculaires radio-induites sur le système vasculaire pour des doses supérieures à 1- 2 Sv *(Borghini et al. 2013)*

Pour un temps court de contamination de 3 mois, et bien qu'à ce stade les animaux n'aient pas encore développé de plaques d'athérome au niveau du sinus aortique **(Nakashima, et al. 1994)**, un premier phénomène est observé : un épaississement de la paroi aortique pour les animaux exposés à la plus forte concentration de césium. Le remodelage vasculaire est une réponse adaptative de l'organisme face à divers stimuli **(Secomb, et al. 2012)**. L'augmentation de l'épaisseur aortique corrèle à l'augmentation de l'expression des collagènes 1 et 3, la production/dégradation de collagène intervenant également dans ce processus de remodelage **(Wagenseil and Mecham 2009)**.

Toujours à ce temps d'exposition court et pour ce groupe d'animaux, nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de l'expression d'un marqueur de la dysfonction endothéliale, VCAM-1, qui promeut l'adhésion des monocytes à la surface de l'endothélium pour permettre ensuite leur internalisation **(Dansky, et al. 2001)**, ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'ARNm de cytokine pro-inflammatoire, IFN-γ.

Lorsque l'on se place à des temps d'exposition plus tardifs, l'étude du profil inflammatoire révèle que les niveaux d'expression des cytokines sont significativement diminués au cours du temps. L'effet « anti-inflammatoire » de l'irradiation à faibles doses en radiothérapie a déjà été rapporté dans de précédentes études, notamment dans le traitement des douleurs de l'ostéoarthrite **(Arenas, et al. 2012)**. Cette revue de 2012 reprend les diverses hypothèses proposées quant aux mécanismes « anti-inflammatoires » que peuvent induire une exposition à faibles doses, et notamment grâce aux études réalisées *in vitro*. Il ressort de ces études qu'une telle exposition pourrait induire :

- une diminution de l'adhésion des granulocytes aux cellules endothéliales (doses de 0,1 à 0,5 Gy) **(Kern, Keilholz et al. 2000)**,
- une diminution de l'expression des molécules d'adhésion (E- sélectines, ICAM, VCAM) **(Hildebrandt, Radlingmayr et al. 2003)**,
- une diminution de l'activité de la iNOS, entraînant une baisse de NO et de ROS **(Hildebrandt, Radlingmayr et al. 2003)**,
- une augmentation de l'activation du facteur de transcription NF-κB **(Rodel, Schaller et al. 2004)**,
- une augmentation de l'expression de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 et TGF-β1 **(Rodel, Schaller et al. 2004)**.

En 2009, une équipe japonaise a publié un travail réalisé sur des macrophages murins irradiés à 0,5 Gy, dans laquelle les auteurs se sont intéressés aux effets « anti-inflammatoires » induit par exposition à faibles doses, en s'intéressant plus particulièrement à l'état de phosphorylation de p38 MAPK et à la production de cytokines. Ils montrent que sur les cellules utilisées (lignée RAW264.7, macrophages murins, communément utilisés comme modèle de la réponse inflammatoire), irradiées à 0,96 Gy/min, entraîne une déphosphorylation de ERK1/2 et de p38 MAPK, médiée par une surexpression de MKP-1[21], dont l'expression augmente avec l'exposition. La conséquence de cette déphosphorylation est d'entraîner une suppression de la production de cytokine pro-inflammatoire, en

[21] MKP-1 : Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1

l'occurrence de TNF-α, dans cette lignée de macrophages **(Tsukimoto, Homma et al. 2009)**. Cette voie de signalisation pourrait être explorée dans notre modèle *in vivo*, de même que celles évoquées plus haut.

Dans notre étude, la baisse d'expression des cytokines inflammatoires est à mettre en lien avec une baisse de l'infiltrat macrophagique au niveau des plaques d'athérome formées au niveau du sinus aortique. De plus, malgré que les plaques soient de taille identique entre les groupes exposés ou non, chez les souris recevant la plus forte concentration de césium, on observe un contenu en collagène plus important, avec également une baisse de l'expression de certaines collagénases (MMP-8 et MMP-13). Ces résultats laissent supposer qu'une exposition pourrait améliorer les paramètres de stabilité des plaques classiquement étudiés, et sont en accord avec une étude réalisée sur ce modèle de souris prédisposées, irradiées à faibles doses **(Mitchel, et al. 2011)**. Pour compléter ces résultats, l'étude de l'expression et de l'activité des inhibiteurs des MMPs (les TIMPs) serait à évaluer.

Dans l'étude de *Mitchel et al*, les auteurs rapportent que lorsque le débit de dose d'irradiation est faible, les lésions athéromateuses sont moins développées qu'avec un débit de dose plus élevé. Pour une même dose atteinte avec deux débits de doses différents, les effets sont opposés, avec une augmentation de la taille des plaques notamment pour les forts débits de doses. Bien que les modalités d'expositions soient différentes, les observations *in vivo*, sont également confirmées dans des études *in vitro*, dans des cultures de cellules endothéliales dans laquelle les auteurs exposent des cellules HUVECs à des débits de doses différents et observent que les cellules entrent en sénescence plus rapidement lorsque le débit de dose est plus élevé **(Yentrapalli, et al. 2013a)**.

Dans notre étude d'irradiation chronique des HUVECs à différents débits de doses, nous avons pu mettre en évidence qu'à la même dose cumulée de 2,1 Gy administrée à des débits de doses différents les paramètres inflammatoires des HUVECs étaient augmentés, et la capacité fonctionnelle des cellules à former des réseaux dans le matrigel diminuée avec le débit de dose plus fort (4,1 mGy/h), comparativement à l'exposition au débit de dose plus faible (1,4 mGy/h). De plus, les cellules HUVECs et HAoSMC exposées par irradiation

chronique ou *via* la contamination au césium 137 du milieu, relarguent des quantités plus importantes de cytokines pro-inflammatoires dans le milieu de culture (MCP-1 et IL-6).

Aux vues des résultats qui découlent des diverses expérimentations *in vivo* et *in vitro*, il apparaît clairement qu'une exposition à de faibles doses/faibles débits de doses induit des modifications différentes qu'une exposition à de fortes doses. L'extrapolation linéaire des effets à fortes doses n'est donc vraisemblablement pas appropriée dans le domaine des faibles doses. L'ensemble de résultats obtenus au cours de ma thèse semblent indiquer qu'aux faibles doses et faibles débits de doses on n'observe pas d'effet linéaire entre dose et effet. Il semblerait même, suite aux résultats obtenus *in vivo*, que la baisse inflammatoire identifiée à faible dose, impacte de façon positive des pathologies inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose.

Une exposition à de faibles doses semble faire intervenir des mécanismes de défense permettant le maintien homéostatique de l'organisme après exposition à un stress, aussi minime qu'il soit. Ces mécanismes mis en jeu sont connus sous le nom de « réponse adaptative ». Celle-ci a été fréquemment observée et décrite ces dernières années dans de nombreux organismes (des bactéries aux Mammifères, dont l'homme), lors d'exposition à faibles doses à des substances toxiques ou lors d'irradiation externe. Une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène reposerait sur l'expression de gènes normalement muets, permettant l'expression d'enzyme de réparation du matériel génétique. Une autre piste s'appuie sur l'induction d'enzymes ayant la capacité d'éliminer les agents toxiques générés par les cellules lorsqu'elle reçoit une certaine dose de radiation.

Ces mécanismes d'adaptation font intervenir différents systèmes permettant d'éviter que les dommages cellulaires portent à conséquence en induisant des pathologies : système de défense anti-oxydant, le système immunitaire, la réparation de l'ADN, apoptose…

Lorsque l'on s'intéresse aux mécanismes qui pourraient expliquer de tels résultats, la modulation de la balance oxydative apparait comme l'une des pistes envisageable.

En effet, dans notre étude nous avons pu voir qu'au bout de 3 mois, malgré que les niveaux aortique d'$0_2.^-$ soient comparables dans tous nos groupes, nous constatons une variation de l'expression génique de deux sous-unités de la NADPH oxydase, ainsi que de celle de la catalase (p=0.058). L'équilibre oxydatif semble être maintenu à ce temps. En revanche, aux temps plus tardifs, cet équilibre semble évoluer de façon bénéfique, par l'augmentation de l'activité anti-oxydante (GPx) au niveau aortique.

L'augmentation de l'activité d'enzymes anti oxydantes a été également décrite dans des études expérimentales d'irradiation aux rayons-X à 200 mGy dans des splénocytes murins, dont la GPx et la SOD **(Yamaoka, et al. 1998)**.

Plus récemment, une équipe japonaise a réalisée des irradiations corps entier sur des souris (0,5 Gy), et en a extrait les rates. Ils montrent ainsi que les rates de souris irradiées présentent des taux de glutathion plus élevés que les témoins à 2 heures post irradiation, jusqu'à 6 heures post-irradiation, avant de retourner à un niveau basal, et que cela est lié avec une augmentation de l'activité des cellules « natural killer » (NK). Les auteurs montrent que l'activité des NK augmente de façon dose dépendante avec la concentration en GSH (forme du glutathion réduit). Ces résultats suggèrent qu'une exposition à faibles doses de rayonnement ionisant pourrait stimuler le système immunitaire, en augmentant les concentrations de GSH qui pourraient être en partie responsable de l'augmentation de l'activité des NK **(Kojima, et al. 2002)**. Concernant les cellules immunitaires, une étude des populations lymphocytaires après contamination interne chronique, réalisée au laboratoire sur des souris contaminées pendant à des concentrations « post accidentelles » comme celle de mon travail (20 $kBq.L^{-1}$), ne permet pas de mettre en évidence de changement significatif entre les différents groupes d'animaux contaminés ou non (analyse phénotypique des cellules sanguines circulantes, **figure 15**) **(Bertho, et al. 2011)**.

Ainsi, l'augmentation de l'activité anti-oxydante pourrait œuvrer en faveur d'une baisse des paramètres inflammatoires, comme cela a déjà pu être rapporté dans d'autres types d'expositions **(Kataoka 2013)**.

L'activation du système anti-oxydant pourrait être un mécanisme d'adaptation qui se met en place suite à une stimulation par une exposition à faible dose. Cette activation conduirait à une baisse des ROS, entraînant des effets anti-inflammatoires, et limiterait les dommages cellulaires. Contrairement, une exposition à de fortes doses, où l'on observe une baisse de l'activité du système anti-oxydant en faveur d'une augmentation des ROS est néfaste pour l'intégrité cellulaire et tissulaire.

Vers de nouvelles perspectives d'études…

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse ouvre de nombreuses perspectives d'études mécanistiques afin d'identifier les cibles/voies de signalisation potentielles d'une exposition chronique aux faibles doses.

- **Le remodelage matriciel**

Les résultats obtenus *in vivo* au temps précoce mènent à étudier par quels mécanismes, au niveau cellulaire, une exposition chronique à faibles doses induit ces modifications fonctionnelles et structurales des vaisseaux à court terme. En effet, la paroi artérielle réagit en permanence à son environnement, par un processus appelé « remodelage vasculaire ». Le remodelage vasculaire implique de nombreux acteurs comme la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la média.

Afin d'explorer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le remodelage vasculaire après exposition aux faibles doses, des modèles *in vitro* de cellules musculaires

lisses isolées ou en co-culture ainsi que des modèles de culture organotypique de vaisseaux perfusés et maintenus sous pression doivent être développés.

Dans un premier temps, afin de mieux comprendre les mécanismes au niveau des cellules de l'arbre vasculaire, des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) de la média, responsables de la prolifération et du remodelage vasculaire, seront exposées *in vitro* aux faibles doses de manière chronique. Après l'exposition, les voies de signalisation impliquées en particulier la voie du TGF-β seront explorées. L'implication du contrôle redox et de la balance pro/anti-inflammatoire sur cette voie seront particulièrement étudié. Ces mécanismes seront identifiés en regard de la fonctionnalité des CMLv (prolifération, migration…). De plus, la fonctionnalité des vaisseaux pourra être explorée par des études organotypique de vaisseaux perfusés. Les acteurs clés identifiés seront validés *in vivo* par l'utilisation de modèles animaux génétiquement modifiés (notamment avec le système de recombinaison CRE-lox).

- **Les cellules souches circulantes**

L'implication des cellules souches circulantes, notamment les progéniteurs de cellules endothéliales (EPCs) dans la progression ou la stabilisation de la pathologie athéromateuse ont bien été identifiés. En effet, il a été montré que les EPCs peuvent participer aussi bien à l'adaptation physiologique ou à la dysfonction pathologique d'une région vasculaire donnée. De ce fait, l'homéostasie des EPCs peut aussi bien être perturbée par des facteurs pro-athérogènes ou au contraire les EPCs peuvent avoir un rôle réparateur de l'endothélium lésé par ces mêmes agents. Il a été montré aussi bien *in vitro* que dans des études cliniques, qu'une baisse inflammatoire peut avoir une forte influence sur le nombre et la capacité fonctionnelle des EPCs influant sur la stabilité des plaques d'athérome. De plus, une étude sur les faibles doses d'irradiation a mis en évidence une augmentation du nombre des EPCs qui sont mobilisées afin de réduire les lésions vasculaires.

De ce fait, il est intéressant d'étudier l'effet d'une exposition chronique à faibles doses sur la quantité d'EPCs circulants et plus particulièrement des EPCs dans le maintien de l'intégrité

vasculaire mais également de leur implication dans l'augmentation de la stabilité des plaques d'athérome. Pour cela des études *in vivo* d'exposition chronique doivent être entreprises afin d'identifier si l'augmentation de la stabilité des plaques observée peut être dûe à une forte mobilisation des EPCs dans les tissus lésés induit par la baisse inflammatoire mise en évidence après exposition aux faibles doses chronique.

- **La réponse adaptative : Le rôle de la balance inflammatoire**

Lors d'une exposition à un stress modéré, parmi les mécanismes adaptatifs mis en jeu, la réponse immunitaire joue un rôle important non seulement dans la neutralisation de l'effet initial du « stresseur » mais elle peut également avoir un effet protecteur sur l'organisme.

En effet, il a clairement été mis en évidence dans la littérature qu'une exposition à faibles doses de rayonnements ionisant peut induire une baisse inflammatoire aussi bien sur des modèles animaux que cellulaires. Il a été montré que les faibles doses de rayonnements ionisants avaient un rôle immunomodulateur, produisant un effet anti-inflammatoire. L'efficacité de ce rôle anti-inflammatoire a été démontrée dans le traitement de maladies inflammatoires de dégénérescence osseuse notamment. Différentes hypothèses ont été suggérées pour expliquer la baisse inflammatoire après exposition aux faibles doses de rayonnements ionisants, comme évoqué au début de la discussion.

Les résultats obtenus *in vivo* au temps tardif sur la stabilité et la taille des plaques d'athérome suggèrent que les faibles doses chroniques de rayonnement ionisant peuvent avoir à terme un effet protecteur (ou « **hormesis »**) passant par une augmentation de l'expression d'enzymes anti-oxydantes ainsi que des paramètres anti-inflammatoires. Ces observations *in vivo* mènent à mieux identifier au niveau cellulaire les mécanismes adaptatifs de type anti-inflammatoire mis en jeu. La baisse importante de l'inflammation observée peut-être médiée par la voie du TGF-β qui non seulement est indispensable à l'activité des lymphocytes T régulateurs qui maintiennent l'homéostasie mais cette cytokine puissamment anti-inflammatoire est un fort inducteur de la production de collagène par les CMLv. Ainsi cette cytokine, outre son action anti-inflammatoire qui permet de réduire

l'inflammation, peut potentiellement induire la formation de plaques d'athérosclérose peu inflammatoires et très stables.

Dans les études envisagées, le but sera de mieux comprendre l'implication de la voie du TGF-β par des inhibiteurs spécifiques ou des modèles KO afin d'identifier l'implication de cette voie dans la radio-adaptation des cellules vasculaires.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

La problématique de ma thèse était d'étudier dans quelle mesure une exposition chronique à faibles doses de rayonnement ionisant pouvait influer sur la progression de la pathologie athéromateuse.

L'ensemble de mon travail de thèse montre pour la première fois qu'une exposition interne chronique à de faibles doses de rayonnement ionisant, n'aggrave pas le contexte athéromateux, chez des souris prédisposées ApoE$^{-/-}$. En effet, malgré un remodelage vasculaire aortique précoce, mis en évidence sur les animaux exposés à la concentration en césium la plus élevée (100 kBq.L^{-1}, correspondant à une concentration cinq fois plus élevée que celle retrouvée en territoire contaminé, autour de Tchernobyl) celui-ci ne porte pas à conséquence sur le développement de la pathologie.

En effet, aux temps plus avancés d'exposition et de progression naturelle de l'athérosclérose, l'étude phénotypique des plaques d'athérome formées au niveau du sinus aortique, dans ce groupe de souris contaminées à la plus forte concentration, présentent des paramètres de stabilités renforcés et d'inflammation moindre que le groupe témoin : quantité de collagène intra-plaque plus importante, diminution de l'infiltrat macrophagique, diminution de l'expression génique de collagénases, ainsi qu'une augmentation de l'activité d'enzyme « anti-oxydante ».

L'approche *in vitro* a confirmé l'importance du débit de dose dans l'atteinte cellulaire identifiée par une hausse inflammatoire et une perte fonctionnelle des cellules.

Les études menées au cours de ma thèse soulignent que l'extrapolation des effets observés à fortes doses de rayonnements ionisants aux faibles doses n'est pas exact et que le débit de dose est un paramètre fondamental à considérer dans le domaine de la radioprotection.

Il est donc important à l'avenir de poursuive les études expérimentales dans ce domaine des faibles doses, notamment pour l'identification de seuils d'apparition des effets, ainsi que pour une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en place.

A l'avenir, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans une exposition à faibles doses de rayonnement ionisant pourrait contribuer à l'amélioration du système de Radioprotection.

Valorisations

VALORISATIONS

1. Publications

Acceptée

- "Chronic gamma irradiation induces a dose-rate dependent pro-inflammatory response and associated loss of function in human umbilical vein endothelial cells"

[1]T. Ebrahimian, **[1]C. Le Gallic**, [1]J. Stefani, [1]I. Dublineau, [3]R. Yentrapalli, [2]M. Harms-Ringdahl, [2]S Haghdoost.

1. IRSN: Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, Service de radiobiologie et d'épidémiologie, Laboratoire de RadioToxicologie Experimentale, 92262, Fontenay-aux-Roses, France.
2. Centre for Radiation Protection Research, Department Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, 106 91 Stockholm, Sweden.
3. Institute of Radiation Biology, Helmholtz Zentrum Munchen, German Research Centre for Environmental Health, Neuherberg, Germany.

(Acceptée dans *Radiation Research*, en ligne depuis mars 2015)

Soumises/en révision

- "Effects of a sub-chronic internal exposure to low dose of ^{137}Cs on vascular remodelling in ApoE$^{-/-}$ mice"

[1]C. Le Gallic, [1]F. Sokhona, [1]JM. Bertho, [1]P.Lestaevel, [2]S. Lehoux, [1]T.G. Ebrahimian

1. Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, Laboratoire de RadioToxicologie Expérimentale, 92262, Fontenay-aux-Roses, France.
2. Mc Gill University, Division of experimental medicine, Montreal, Canada

(Soumission dans *Atherosclerosis*, janvier 2015)

- " Chronic internal exposure to low dose ^{137}Cs induces positive impact on the stability of atherosclerotic plaques by reducing inflammation in $ApoE^{-/-}$ mice "

[1]C. Le Gallic, [1]Y. Phalente, [1]L. Manens, [1]I. Dublineau, [1]M.Benderitter, [1]Y.Gueguen, [2]S. Lehoux, [1]T.G. Ebrahimian

1. IRSN. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de RadioToxicologie Experimentale, 92262, Fontenay-aux-Roses, France.
2. Lady Davis Institute, McGill University, Montreal, Canada

(En révision dans *PlosOne*, janvier 2015 – révisions mineures) → acceptée, juin 2015

2. Communications

Communications affichées

- « Effets d'une contamination interne à court terme par le Césium 137 à faibles doses sur la pathologie athéromateuse chez la souris »
  Journées des thèses de l'IRSN, Octobre 2012, Le Croisic, France

- « Chronic internal ^{137}Cs contamination on early and intermediate stages of atherosclerosis »
  Congrès "DoReMi", Janvier 2013, Paris

- « Differential effects of chronic internal ^{137}Cs contamination on atherosclerosis progression in $ApoE^{-/-}$ mice »
  Congrès "Health Effects of Incorporated Radionuclides", Octobre 2013, Berkeley, USA

- « Effects of an internal ^{137}Cesium contamination on atherosclerosis progression in ApoE$^{-/-}$ mice »
  Congrès « Angiogenesis and Leukocytes in Atherosclerosis », Janvier 2014, Genève, Suisse

- « Effects of a chronic internal low dose of ionizing radiation on atherosclerosis progerssion »
  Congrès « European Atherosclerosis Society », Mars 2015, Glasgow, Ecosse
  (Young Investigator Fellowship Grant)

Communications orales

- « Chronic internal ^{137}Cesium contamination on early and intermediate stages of atherosclerosis »
  Congrès « LowRad », Décembre 2012, Lyon, France

- « Differential effects of a chronic ^{137}Cs internal exposure on atherosclerosis progression »
  Congrès "European Radiation Research Society", Septembre 2013, Dublin, Irlande

- « Effets différentiels d'une exposition chronique au ^{137}Cs sur la progression de l'athérosclérose »
  Journées de l'Ecole Doctorale ED425, Juin 2013, Le Kremlin-Bicêtre, France

- « Effets différentiels d'une exposition chronique au ^{137}Cs sur la progression de l'athérosclérose »
  Journées des Thèses de l'IRSN, Octobre 2013, Giens, France

- « Effets d'une exposition chronique au ^{137}Cs sur la progression de l'athérosclérose »
  Journées des Thèses de l'IRSN, avril 2014, Paris, France

- « Chronic γ irradiation induces a dose-rate dependent pro-inflammatory response and associated loss of function in HUVECs »
  Congrès "DoReMi", juillet 2014, Munich, Allemagne

3. Autres

- Obtention du Diplôme Universitaire de l'Institut de Formation Supérieure BioMédicale – Faculté de Médecine de Paris Sud (en 3 ans, en parallèle de la réalisation de la thèse)

- Obtention du diplôme d'expérimentation animale de niveau 1 – Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (mars 2012)

- Encadrement d'une stagiaire de licence professionnelle en biotechnologies

Annexes

ANNEXE I

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Chronic Internal Exposure to Low Dose ^{137}Cs Induces Positive Impact on the Stability of Atherosclerotic Plaques by Reducing Inflammation in ApoE$^{-/-}$ Mice

Clélia Le Gallic[1], Yohann Phalente[1], Line Manens[1], Isabelle Dublineau[1], Marc Benderitter[1], Yann Gueguen[1], Stephanie Lehoux[2‡], Teni G. Ebrahimian[1‡*]

1 IRSN, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de RadioToxicologie Experimentale, 92262, Fontenay-aux-Roses, France, **2** Lady Davis Institute, McGill University, Montreal, Canada

‡ These authors are shared senior authors on this work.
* teni.ebrahimian@irsn.fr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Le Gallic C, Phalente Y, Manens L, Dublineau I, Benderitter M, Gueguen Y, et al. (2015) Chronic Internal Exposure to Low Dose ^{137}Cs Induces Positive Impact on the Stability of Atherosclerotic Plaques by Reducing Inflammation in ApoE$^{-/-}$ Mice. PLoS ONE 10(6): e0128539. doi:10.1371/journal.pone.0128539

Academic Editor: Esther Lutgens, University of Amsterdam Academic Medical Center, NETHERLANDS

Received: July 8, 2014

Accepted: April 28, 2015

Published: June 5, 2015

Copyright: © 2015 Le Gallic et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by grants from Electricite de France (EDF) but the funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: This work was supported by grants from Electricite de France (EDF) but this does

Abstract

After Chernobyl and Fukushima Daï Chi, two major nuclear accidents, large amounts of radionuclides were released in the environment, mostly caesium 137 (^{137}Cs). Populations living in contaminated territories are chronically exposed to radionuclides by ingestion of contaminated food. However, questions still remain regarding the effects of low dose ionizing radiation exposure on the development and progression of cardiovascular diseases. We therefore investigated the effects of a chronic internal exposure to ^{137}Cs on atherosclerosis in predisposed ApoE$^{-/-}$ mice. Mice were exposed daily to 0, 4, 20 or 100 kBq/l ^{137}Cs in drinking water, corresponding to range of concentrations found in contaminated territories, for 6 or 9 months. We evaluated plaque size and phenotype, inflammatory profile, and oxidative stress status in different experimental groups. Results did not show any differences in atherosclerosis progression between mice exposed to ^{137}Cs and unexposed controls. However, ^{137}Cs exposed mice developed more stable plaques with decreased macrophage content, associated with reduced aortic expression of pro-inflammatory factors (CRP, TNFα, MCP-1, IFNγ) and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin). Lesions of mice exposed to ^{137}Cs were also characterized by enhanced collagen and smooth muscle cell content, concurrent with reduced matrix metalloproteinase MMP8 and MMP13 expression. These results suggest that low dose chronic exposure of ^{137}Cs in ApoE$^{-/-}$ mice enhances atherosclerotic lesion stability by inhibiting pro-inflammatory cytokine and MMP production, resulting in collagen-rich plaques with greater smooth muscle cell and less macrophage content.

not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

After the accidents at Chernobyl (1986) and Fukushima (2011), large amounts of caesium 137 (^{137}Cs) were released into the environment [1]. ^{137}Cs is the main fission product of uranium and plutonium within nuclear reactors. It is a radionuclide which bears a low chemotoxicity but high radiotoxicity, mainly related to emission of β and γ rays [2]. Because ^{137}Cs has a 30 year half-life, it remains one of the major sources of exposure for the population in contaminated territories [3]. Several studies have reported that the youngest children in the contaminated areas exposed to the Chernobyl accident are developing thyroid cancer, bone disorders [4], as well as nervous and digestive system disorders [5]. The cardiovascular system may also be targeted.

The two major contributors to cardiovascular diseases (CVD), myocardial infarction and stroke, arise as a result atherosclerotic plaque rupture. Atherosclerosis is a chronic inflammatory pathology of large and medium arteries [6]. In the course of the atherogenic process, oxidized low-density lipoproteins enter the vascular wall and induce an inflammatory reaction. As a result, endothelial cells express adhesion molecules such as E-selectin (ESel), intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) that are necessary for the adhesion and diapedesis of monocytes. Concurrently, a number of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNFα), interferon gamma (IFNγ), and monocyte chemo attractant protein-1 (MCP-1) are released, promoting monocyte chemotaxis. All of these factors contribute to plaque progression [7]. Monocytes within the lesion differentiate into macrophages which incorporate the oxidized low-density lipoproteins and become foam cells. These lipid-laden cells have low structural strength and contribute to plaque fragility. On the contrary, vascular smooth muscle cells (VSMC) are the main components of atherosclerotic plaques responsible for promoting plaque stability; they produce collagen and other extracellular matrix proteins that constitute the fibrous cap [8], which protects lesions from rupture [9]. It is well documented that vulnerable plaques have high expression of some metalloproteinases (MMP 2, 3, 8 and 13) that degrade matrix components and are responsible for plaque destabilization and rupture [10]. The production of these MMPs by VSMCs and macrophages is regulated by inflammation [6]. Thus, most clinical manifestations of atherosclerosis, which are due to plaque rupture, depend on the change in balance between VSMCs and collagen buildup on the one hand, and foam cell accumulation and fibrous cap degradation by MMPs on the other hand. Inflammation is the primary underlying cause of atherosclerotic plaque instability and rupture [6], and C-reactive protein (CRP), a marker of inflammation, has become the prototypic risk marker for CVD [11].

Exposure to high doses of ionizing radiations increases the risk of CVD due to damages to the heart structure and vessels [12–14]. Liquidators who took part in the repair at Chernobyl are reported to have loss of vascular tone, amplified venous return, and increased myocardial contractility [15]. High levels of ^{137}Cs were observed in the hearts of adults and children living in the contaminated areas of Belarus, and they may be related to a wide variety of changes to this organ, including cardiovascular symptoms, electrocardiography alterations, and hypertension [16], although the elevated blood pressure may be related to not only to the ^{137}Cs but also perhaps to the psychological stress provoked by the accident [17]. Studies of atomic bomb survivors in Japan who received a single dose to the whole body of 0 to 4 Gy, showed a dose-related increase in serum lipids, associated with greater CVD risk [18]. Some studies have even established a link between radiation exposure and atherosclerosis [19]. In patients with Hodgkin's disease, radiation therapy was associated with a greater intima-media thickness, an index of atherosclerotic lesion size [20], and with early onset myocardial infarction [21–24]. Similarly, carotid artery atherosclerosis is described as a relevant complication of neck radiotherapy

[25–27]. However, irradiating existing atherosclerotic lesions in mice led to smaller, albeit more inflamed plaques [28].

However, it is unclear from previous studies whether an association exists between atherosclerosis and low dose radiation exposure [29, 30], and whether the mechanisms implicated differ from high-dose effects [31]. These questions are particularly pertinent in the setting where the re-population of contaminated territories is envisioned after a nuclear accident. An experimental study in rats showed that chronic exposure to low doses of ^{137}Cs decreased mean arterial blood pressure but increased the expression of angiotensin and brain natriuretic peptide [32], which could have opposite effects on atherosclerosis. However, in diabetic mice, repeated low-dose radiation reduced lipid levels and attenuated inflammation [33], and reduced cardiac expression of multiple inflammatory agents [34]. Likewise, multiple low-dose irradiation of mice reduced inflammatory signalling in a mouse model of asthma [35].

Hence, anti-inflammatory effects of low dose radioactivity were reported in models of chronic inflammatory diseases. We therefore hypothesized that chronic low dose exposure to ^{137}Cs would regulate atherosclerosis progression in mice. Genetically predisposed Apolipoprotein E$^{-/-}$ (ApoE$^{-/-}$) mice [36, 37] were chronically exposed to 20, 100 or 500 Bq/animal of ^{137}Cs administrated through drinking water. Our dosing range (4–100 kBq/l) corresponded to a range spanning 5 times less and 5 times more than the concentration of 20 kBq/l used in previous studies [38]. More importantly, our ingestion rates are close to the estimated ingestion rates of 20 to 2100 Bq/day that were calculated to be ingested by humans living in contaminated areas [39]. As a whole, ^{137}Cs contamination of human tissues was previously found to be in the range of 100 and 2000 Bq/kg, measured in the whole body [40], in urine samples [41] or in organs at autopsy [42, 43]. We investigated atherosclerosis progression along with oxidative stress balance, inflammatory status and indices of plaque stability at different stages of the pathology.

Material and Methods

Animals

7–8 week-old ApoE$^{-/-}$ male mice were obtained from Charles River Laboratory. Each group was comprised of 10 animals. ApoE$^{-/-}$ mice are homozygous null for a functional ApoE gene on a C57BL/6J background. Apolipoprotein E acts as the main ligand mediating removal of cholesterol enriched chylomicron and very low density lipoprotein remnants from the blood stream and plays an important role in lipoprotein metabolism. These mice develop atherosclerosis when fed with a normal low fat diet. The morphological features of early-stage lesions in ApoE$^{-/-}$ mice are very similar to those found in humans [44]. Animals were maintained in a specific-pathogen-free environment and monitored daily. All experiments and procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as published by the French regulations for animal experiments (Ministry of Agriculture Order No. B92-032-01, 2006) with European Directives (86/609/CEE), and approved by the local ethical committee of the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (Permit Number: P10-11 and thematic number: T29).

Cs 137 exposure

Animals were separated into 4 groups: ApoE$^{-/-}$ mice receiving either tap water *ad libitum* or tap water *ad libitum* supplemented with 4, 20 or 100 kBq/l of ^{137}Cs (^{137}CsCl final concentration $5x10^{-9}$M, CERCA-LEA, Pierrelatte, France), during 6 or 9 months.

Blood sampling and analysis

Mice were terminally anesthetized by intraperitoneal injection of ketamin/xylazin (Ketamine 500 Virbac, Rompun 2% Bayer). Blood was collected by intracardiac puncture with a heparinised syringe. Blood was centrifuged for 8 minutes at 800 *g* and plasma was harvested and frozen for subsequent analysis. Plasma cholesterol, low and high density lipoproteins (LDL and HDL) levels were determined with an automated spectrophotometric system (Konelab 20, Biological Chemistry Reagents, Thermo Electro Corporation).

Tissue collection

Hearts (including the aortic root) were separated from the aorta, embedded in optimum cutting temperature medium (OCT, Sakura Fineteck), and snap-frozen on a metal plate that was cooled with liquid nitrogen. Aortas were excised from the aortic arch to the femoral bifurcation and directly snap frozen on liquid nitrogen. The thoracic and abdominal aortas were separated for gene and protein expression analysis.

Cs 137 measurement

Gamma spectrometry with a gamma counter (Packard Cobra Model II D5003) was used to measure ^{137}Cs. The gastrocnemus muscle was counted for 60 minutes, and the count was related to its weight. The detection limit ranged from 4.2 to 12 counts per minute per sample, depending on the mass of the organ tested and the duration of the counting period. The radiation dose received by the muscle was calculated according to models developed for rodents [45], as previously described [46].

Gene expression

Total RNA from thoracic aortas was extracted. Briefly, aortas, are grinded with a Precellys 24 (Bertin Technologies) using TRI Reagent solution (Sigma-Aldrich). After extraction, we performed RNA purification (RNeasy Mini Kit, Qiagen). RNA quality was checked by measuring the ratio of optical densities at 260 and 280 nm. Real-time qPCR (RT-qPCR) was used to analyse the mRNA levels of inflammatory cytokines and adhesion molecules: CRP, TNFα, MCP-1, IFNγ, ICAM-1, VCAM-1, and ESel. Oxidative stress balance was evaluated by mRNA expression of pro and anti-oxidant enzymes catalase (CAT), heme oxygenase 1 (HO-1), nuclear factor-like 2 (Nrf2), and gluthathione peroxydase (GPx). Finally, the mRNA expression of collagen type III (col3a1) and MMP13 was evaluated. Real-time qPCR was performed with an Abi Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using SYBR Green (Applied Biosystems). All samples were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to analyse the results [47]. All RT-qPCR results are expressed as mean ± SEM, and compared to expression levels of non-exposed group, which is set at 1. Primers were designed using Primer-BLAST software (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Sequences of the forward and reverse primers used are listed in Table 1.

Aortic protein expression and activity

Total aorta proteins were extracted according the manufacturer's instructions (Total protein extraction kit, Millipore), and protein quantity was measured by a classic Bradford assay. To assess the expression of MMPs implicated in atheromatous plaque destabilization (MMP2, MMP3 and MMP8) in aorta, we perform a multiplex analysis on protein extracts according the manufacturer's instructions (MMMP1MAG-79K, Merck Millipore). GPx activity was

Table 1. Primers sequences used for RT-qPCR. Primers sequences were obtained using Primer-BLAST.

Gene	Genebank accession n°	Strand	Sequence
Col3a1	NM_009930.2	Sense	5'TCCCTGGAATCTGTGAATC3'
		Antisense	5'TGAGTCGAATTGGGGAGAAT3'
Gapdh	NM_001289726.1	Sense	5'CCCCAGCAAGGACACTGAGCAAG3'
		Antisense	5'TGGGGGTCTGGGATGGAAATGTGA3'
Gpx1	NM_008160.6	Sense	5'CTGTGAACTCTTGTCAATG3'
		Antisense	5'AACTGTGTCAGGTATCTCC3'
Hmox1	NM_010442.2	Sense	5'GGGACTACACCGAGATGAACG3'
		Antisense	5'TCCGCAGGAAGGTAAAGAGC3'
Hprt	NM_013556.2	Sense	5'TCAGTCAACGGGGGACATAAA3'
		Antisense	5'GGGGCTGTACTGTTAACCAG3'
Icam1	NM_010493.2	Sense	5'TTCTCATGCCGCACAGAACT3'
		Antisense	5'TCCTGGCCTCGGACACACATTA3'
Ifng	NM_008337.3	Sense	5'TCTGGGTTCTCCTCCTGCGGC3'
		Antisense	5'GGCGCTGGACCTGTGGGTTG3'
Mcp1	NM_011333.3	Sense	5'GCACCAGCACCAGCAACTCT3'
		Antisense	5'TGGATGCTCCAGCCGGCAACT3'
Mmp13	NM_008607.2	Sense	5'ACAGGCTCCGAGAAATGCAA3'
		Antisense	5'CCACATCAGGCACTCCACAT3'
Nfe2l2	NM_010902.3	Sense	5'CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA3'
		Antisense	5'GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT3'
Sele	NM_011345.2	Sense	5'ATGCAGCGCACAAGGGCAGT3'
		Antisense	5'CCCGTGGCACCACACGTCAG3'
Tnf	NM_013693.3	Sense	5'GACAAGGCTGCCCCGACTA3'
		Antisense	5'AGGGCTCTTGATGGCAGAGA3'
Vcam1	NM_011693.3	Sense	5'AAGCCGGTCACGGTCAAGT3'
		Antisense	5'GGTCACCCTTGAACAGAGATCAATC3'

doi:10.1371/journal.pone.0128539.t001

measured in aortic protein extracts according the manufacturer's instructions (Glutathione Peroxidase Assay Kit, Cayman Chemical). GPx activity in tissues from non-exposed mice was set at 100%.

Histological and immunohistochemical analyses of aortic plaque phenotype

Cryosections of 7 μm thickness were cut from the origin of the aortic root throughout the aortic sinus, for histological and immunohistochemical analysis. All images were acquired using an Axiophot (Zeiss). Mean lesion area and composition was calculated using Histolab software (GT Vision LTD) as described previously [48, 49]. Lesion area of control, unexposed mice was set as 100% relative to the total aortic sinus area. Quantification of the positive stain area of plaque components was calculated as a proportion of total lesion area, with values in control, unexposed mice set as 100%.

Lipid and collagen staining. Five to seven sections per animal were stained for the oil red O (Sigma-Aldrich) to evaluate the lesion area, and 5–7 sections per animal were stained with Picrosirius red (Sigma-Aldrich) to evaluate plaque collagen content.

Smooth muscle alpha-actin and macrophage immunostaining. VSMC and macrophage content were determined by immunofluorescence using monoclonal anti-α-smooth muscle cell actin (clone 1A4, Life Science A5691) and anti-CD68 (Abcam 1252), respectively. The

aortic sinus cryosections were incubated then with primary antibody (1:100), rinsed, and further incubated with fluorescently labeled secondary antibodies (1:500) (Invitrogen). At least five sections per animal were stained. For negative controls, sections were incubated with secondary antibody only. Nuclei were stained with DAPI.

Superoxide and MMP activity staining. The evaluation of reactive oxygen species (ROS) production in the entire plaque area of the aortic sinus was performed by Dihydroethidium staining (DHE, 2 μM; Molecular Probes), applied during 30 minutes at 37°C. For negative control, sections were incubated with PBS 1X only. To assess MMP activity, aortic sinus cryosections were incubated at 37°C for 24 hours with fluorogenic gelatine substrate (DQ gelatine, Molecular Probes, Life Technologies) in a dark humid chamber. Slides were rinsed in PBS and nuclei stained with DAPI. Negative control sections were incubated without DQ-gelatine. All slides were independently examined on a blinded basis for the level of ROS or MMP staining, using a 0- to 4- point intensity gradient.

Statistical Analysis

Experiments were made with 10 animals per group per experimental condition. To verify the normality, we performed a Shapiro-Wilk test. All data followed a Gaussian distribution. One-way ANOVA and *Student's t-test* was used to compare exposed and non-exposed animals results. All results are expressed as means ± SEM. Statistical software Sigma Plot 11.0 (SPSS) was used for all statistical analysis. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Chronic exposure to 137Cs has no effect on animal general health parameters or plasma lipid levels

We found that ^{137}Cs activity increased proportionally to ^{137}Cs intake in the skeletal muscle of animals, where it accumulates preferentially (Fig 1). The activity expressed in Bq/g of tissue in the skeletal muscle after 6 months exposure was 0.12 ± 0.09; 8.00 ± 0.11; 37.58 ± 0.20; 191.91 ± 0.50 for 0, 4, 20 and 100 kBq/l respectively, and after 9 months exposure was 0.08 ± 0.08; 10.02 ± 0.15; 46.49 ± 0.49; 278.41 ± 1.00 for 0, 4, 20 and 100 kBq/l respectively. The resulting absorbed radiation doses due to ^{137}Cs ingestion were calculated as previously described [46] and were 3, 15, and 75 mGy after 6 months and 6, 30, and 150 mGy after 9 months exposure to 4, 20 and 100 kBq/l of ^{137}Cs, respectively. Exposure to ^{137}Cs did not alter body weight in ApoE$^{-/-}$ mice at any time over the 9 months of treatment, compared with unexposed mice (Fig 2). Likewise, plasma concentration of total cholesterol, HDL and LDL was equivalent in all groups irrespective of ^{137}Cs concentrations (Table 2).

Chronic exposure to 100 kBq/l 137Cs does not influence plaque size but it alters plaque inflammatory profile

Atherosclerotic lesion size was measured in the aortic sinus of ApoE$^{-/-}$ mice. No differences in plaque area were observed between ^{137}Cs-exposed animals and non-exposed animals (Fig 3). Nevertheless, we investigated lesion composition in all groups. Macrophages are one of the major inflammatory cell types implicated in atherosclerosis progression and often the most abundant cells within lesions. To quantify macrophages within plaques, we performed a CD68 immunostaining. Our results show a decrease in CD68^{+} staining in lesions of mice exposed to 20 and 100 kBq/l ^{137}Cs during 6 months (Cs 20: 54.0% ± 10.0%; Cs 100: 45.5% ± 7.7%) compared to non-exposed mice (Fig 4A and 4B). At the 9 month time point, these differences were no longer apparent (Fig 4).

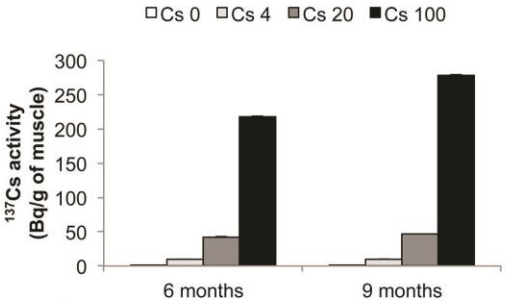


Fig 1. ^{137}Cs activity measurement correlates with ^{137}Cs absorption in the gastrocnemus muscle, validating our experimental model. Activity is expressed as mean ± SEM of n = 8 per group per time.

doi:10.1371/journal.pone.0128539.g001

Chemokine and adhesion molecule expression are key elements in the recruitment and diapedesis of monocytes in the vascular wall. Once inside the atherosclerotic lesion, most of these cells are transformed into macrophages. In keeping with the reduced macrophage content observed in plaques of mice exposed to ^{137}Cs, we found a parallel decrease in the mRNA expression of many pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules, measured by RT-qPCR, in their aortas (Fig 5). Specifically, aortic mRNA expression of CRP, TNFα, MCP-1, IFNγ, VCAM-1, and E-Sel were significantly decreased in ApoE$^{-/-}$ mice exposed during 6 months to 100 kBq/l ^{137}Cs (0.30 ± 0.07-fold, 0.23 ± 0.07-fold, 0.43 ± 0.13-fold, 0.21 ± 0.04-fold, 0.25 ± 0.09-fold, and 0.22 ± 0.10-fold, respectively, compared to un-exposed controls). TNFα, ICAM-1, VCAM-1, and E-SEL mRNA expression were also significantly decreased after 9 months ^{137}Cs exposure (0.36 ± 0.14-fold, 0.40 ± 0.06, 0.52 ± 0.07-fold, and 0.46 ± 0.19-fold respectively). Although aortic MCP-1 mRNA was no longer lowered at 9 months, serum levels of the chemokine were significantly decreased after 9 months 100 kBq/l ^{137}Cs exposure in ApoE$^{-/-}$ mice compared to non-exposed animals (0.13 ± 0.06-fold, $P<0.01$). Hence, ^{137}Cs exposure diminishes chemokine and adhesion molecule expression in ApoE$^{-/-}$ mice, associated with reduced inflammatory cell content in atherosclerotic lesions.

Fig 2. ^{137}Cs exposure does not interfere with weight gain in ApoE$^{-/-}$ mice. Weight (in g) is expressed as mean ± SEM of n = 8 animals per group per time.

doi:10.1371/journal.pone.0128539.g002

Table 2. Evaluation of cholesterol, LDL and HDL plasma content following 6 or 9 month exposure to ^{137}Cs.

		Treatment			
		Cs 0	Cs 4	Cs 20	Cs 100
6 month exposure	Cholesterol (mmol/l)	11.89 ± 1.12	9.97 ± 1.91	9.08 ± 2.05	11.55 ± 1.80
	HDL (mmol/l)	3.38 ± 0.14	2.54 ± 0.39	2.92 ± 0.46	3.01 ± 0.38
	LDL (mmol/l)	8.10 ± 0.71	6.81 ± 1.64	6.31 ± 1.53	7.36 ± 1.43
9 month exposure	Cholesterol (mmol/l)	10.99 ± 1.62	9.30 ± 1.89	12.08 ± 0.67	13.88 ± 1.27
	HDL (mmol/l)	2.80 ± 0.29	2.47 ± 0.40	2.97 ± 0.10	3.21 ± 0.12
	LDL (mmol/l)	7.27 ± 1.15	6.36 ± 1.20	8.20 ± 0.36	9.32 ± 0.61

Chronic ^{137}Cs exposure does not influence plasma lipid parameters. Results are expressed as mean ± SEM of n = 8 animals per group per time.

doi:10.1371/journal.pone.0128539.t002

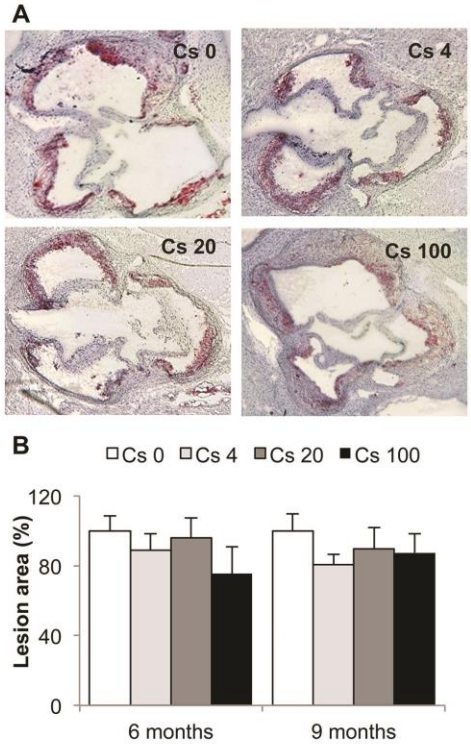


Fig 3. Atheromatous lesion area is not modified by a 6 or 9 month chronic internal exposure to ^{137}Cs. **A:** Representative pictures of oil red O staining on aortic sinus cryosections after 6 months of exposure (magnification x 50). **B:** Quantification of the average lesion area performed using Histolab software. Lesion areas are expressed as mean ± SEM of n = 5 to 7 sections per animal.

doi:10.1371/journal.pone.0128539.g003

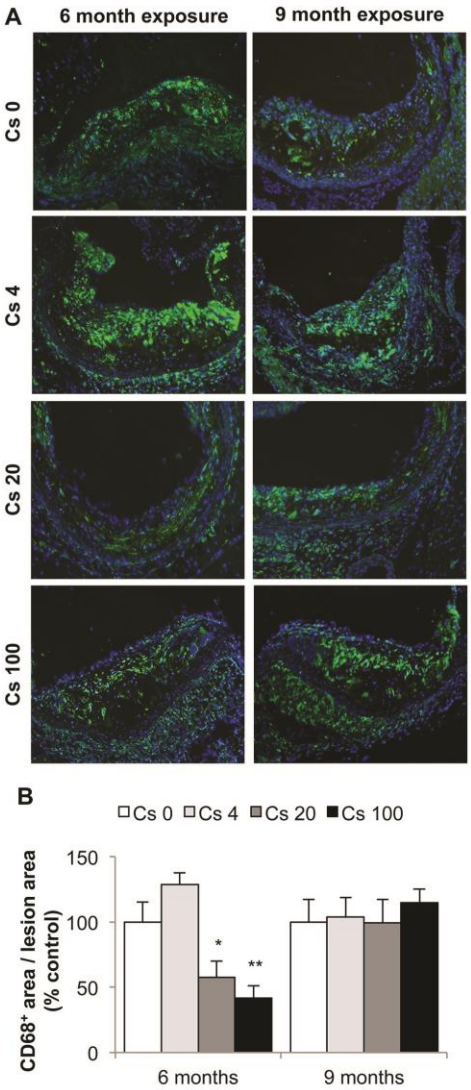


Fig 4. A six months exposure to 20 and 100 kBq/l ^{137}Cs reduces macrophage content in atheromatous plaques. A: Macrophages were detected by CD68 immunostaining (CD68$^+$ cells: green; nuclei: blue). Representative pictures obtained at magnification x100. B: Quantification of CD68$^+$ cell content. Results are expressed as mean ± SEM of CD68$^+$ surface area per plaque surface area, proportional to Cs 0 control group (%). *$p<0.05$, **$p<0.01$ vs non-exposed group. n = 5 sections per animal.

doi:10.1371/journal.pone.0128539.g004

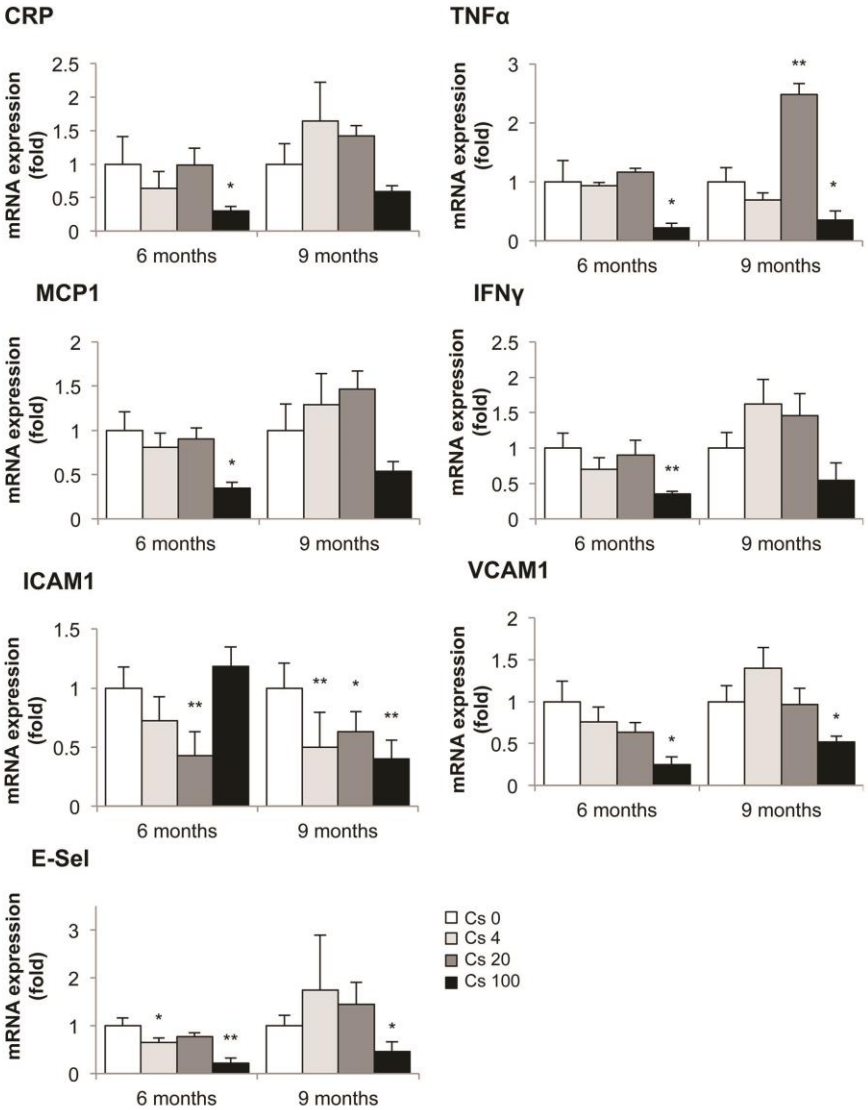


Fig 5. Aortic mRNA expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules following a 6 or 9 month exposure to ^{137}Cs. Levels of CRP, TNFα, MCP-1, IFNγ, ICAM-1, VCAM-1 and E-Sel were determined by RT-qPCR. GAPDH or HPRT were amplified and used as endogenous control. At 6 months, IFNγ and MCP-1 expression was significantly decreased in animals exposed to 100 kBq/l ^{137}Cs compared to non-exposed animals; at 9 months, TNFα and ICAM-1 expression was significantly reduced. Results are expressed as mean of fold change ± SEM of n = 5–8 per group per time. *$p < 0.05$ and **$p<0.01$ versus Cs 0 control group.

doi:10.1371/journal.pone.0128539.g005

Exposure to 100 kBq/l 137Cs increases plaque stability in ApoE-/- mice

The absence of effects of ^{137}Cs on plaque size, despite diminished macrophage content, suggested that other lesion components might be affected by the treatment. Immunohistochemistry for α smooth muscle actin (αSMA), detecting smooth muscle cells (Fig 6A and 6B), and picrosirius red staining for collagen (Fig 6C) showed accentuated levels of both proteins in plaques from ApoE$^{-/-}$ mice exposed to ^{137}Cs. In fact, the 9 month exposure to 20 kBq/l doubled αSMA levels to 220.7 ± 15.4%, compared with non-exposed controls (100% ± 24.1; $p<0.05$). Similarly, quantification of picrosirius red revealed a significant increase in collagen within the plaques of mice exposed to 100 kBq/l ^{137}Cs during 6 (159 ± 20%) and 9 months (137 ± 13%) compared with non–exposed animals (100 ± 14% and 100 ± 11%, respectively, at 6 and 9 months) (Fig 6C and 6D). Finally, type III collagen mRNA expression was also found to be enhanced 2-fold in the aorta of animals exposed to 20 and 100 kBq/l ^{137}Cs during 9 months ($p<0.05$) compared to non-exposed animals (Fig 6*E*).

In plaques, collagen is generally synthesized by smooth muscle cells and degraded by of matrix metalloproteinases (MMP) [50] Hence, we measured MMP2, MMP3 and MMP8 levels in aortic protein extracts by Milliplex assay, and determined aortic MMP13 mRNA expression by RT-qPCR. No differences in MMP2 or MMP3 expression were observed between the different groups (Fig 7A and 7B). However, we observed a significant decrease in both MMP8 (0.34 ± 0.04-fold) and MMP13 (0.33 ± 0.05-fold) in animals exposed to 100 kBq/l ^{137}Cs during 6 months, compared with non-exposed animal (Fig 7C and 7D). Finally, we evaluated MMP2/MMP9 activity by in-situ gelatinase activity, and found no differences between groups (Fig 7E). In summary, ^{137}Cs exposure enhances two parameters associated with increased plaque stability, collagen content and smooth muscle cell content.

Exposure to 100 kBq/l 137Cs has little effect on redox balance in ApoE-/- mice

Oxidative stress is a critical feature of atherosclerosis, contributing to endothelial dysfunction, LDL oxidation, upregulation of inflammatory pathways, and MMP induction. We first evaluated plaque superoxide production by dihydroethidium (DHE) staining. No differences were noted between the different groups of animals at that specific time points (Fig 8A). The aortic mRNA expression of HO-1 and Nrf2, two factors implicated in the oxidative stress response, was also equivalent in all mice (Fig 8B). However, mRNA expression of GPx, an anti-oxidative enzyme, was reduced after 6 months exposure to ^{137}Cs at 100 kBq/l compared with non-exposed animals (0.48 ± 0.05-fold), but no significant difference was observed in GPx activity at this time point (Fig 8C). On the contrary, after 9 months exposure, GPx activity was increased in 100 kBq/l ^{137}Cs-exposed animals compared with non-exposed animals (173 ± 32%), but GPx mRNA expression did not differ from controls (Fig 8C).

Discussion

Our results show that chronic, low dose ingestion of ^{137}Cs during 6 and 9 months had no consequences on plaque size and plasma lipid parameters. However, we observed a decrease in systemic pro-inflammatory cytokines expression, reduced plaque macrophage content, increased smooth muscle cells and collagen content, and lower MMP expression in ^{137}Cs-exposed mice compared to non-exposed animals. Our data therefore indicate that exposure to ^{137}Cs may actually promote a more stable plaque phenotype in mice.

Thus far, two studies tested the effects of chronic exposure to ^{137}Cs, at doses comparable to post-accident exposure, on the cardiovascular system [32, 42]. These two studies yielded

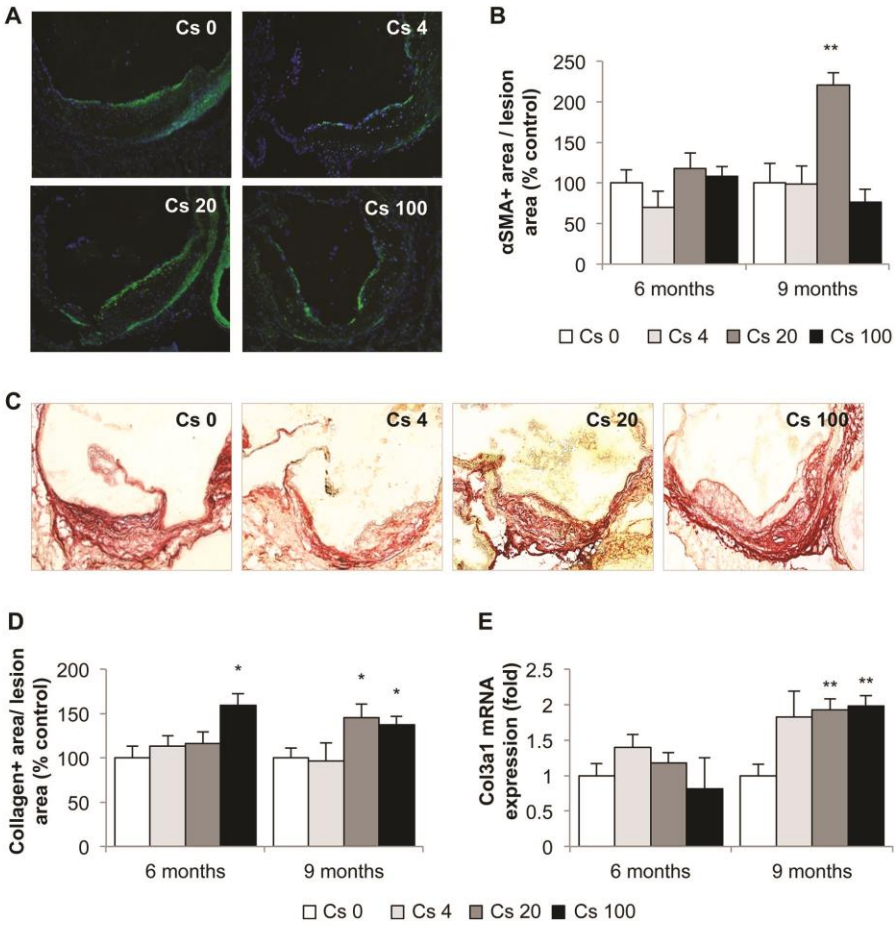


Fig 6. Indices of atheromatous plaque stability are enhanced after 9 months exposure to 100 kBq/l ^{137}Cs. A: αSMA immunostaining for smooth muscle cells (αSMA$^+$ cells: green; nuclei: blue, n = 5 sections per animal) and B: αSMA quantification within the plaques. No difference is observed after 6 months exposure, however, after 9 months exposure, a significant increase in αSMA$^+$ area is noted for the group exposed to 20 kBq/l. C: Picrosirius red staining for collagen was performed on aortic sinus cryosections. Representative images obtained at magnification x100. n = 5 sections per animal. D: Quantification of collagen in the plaque. After 6 and 9 months of exposure to 100 kBq/l ^{137}Cs, collagen content was increased in lesions. E: This result was paralleled by an increase in col3 mRNA expression, assessed by RT-qPCR, in the whole aorta. Results are expressed as mean ± SEM of n = 5–8. *p<0.05 vs Cs 0 control group.

doi:10.1371/journal.pone.0128539.g006

contradictory results. One reported alterations in the cardiovascular system of children who have lived in contaminated territories [42], whereas the other showed subtle changes in blood pressure and in atrial expression of some genes, without any structural, pathological or clinical disorders, in an animal model [32]. Internal exposure to ^{137}Cs during several months was previously reported to have no significant effects in different physiological systems (digestive

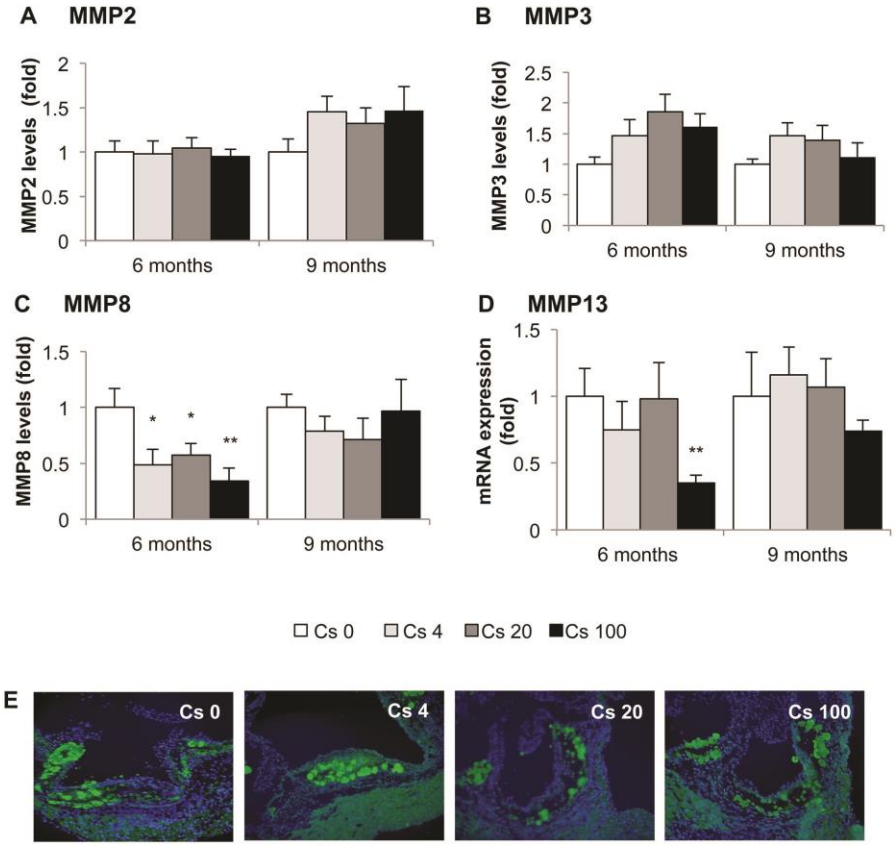


Fig 7. Aortic expression of MMP-2, -3, -8 and -13 mRNA after 6 or 9 months exposure to ^{137}Cs. MMP aorta expression was evaluated using milliplex kit (for MMP2, -3 and -8) and by RT-qPCR for MMP13. A and B: No differences were observed for MMP2 and MMP3 expression levels at every ^{137}Cs concentration and time exposure. C and D: concerning MMP8 and MMP13, we noticed a significant decrease for ApoE$^{-/-}$ Cs100 after 6 months exposure. However, after 9 months, levels of MMP8 and -13 for this group are similar to control level. Results are expressed as mean ± SEM of n = 5–8 animals per group per time. **p<0.01 vs control. E: *In-situ* gelatinase activity, detected by enhanced fluorescence of fluorogenic gelatine substrate within the plaques and no difference were observed in MMP activity whatever the group.

doi:10.1371/journal.pone.0128539.g007

system, central nervous system and immune system) in mice [51–53]. However, most experimental studies on irradiation and atherosclerosis exposed animals to external ionizing radiation for a short time. The results ranged from an increase in inflammation and atherosclerosis progression with high doses [14], to decreased atherosclerosis with very low doses administered at a low dose rate [54]. Interestingly, in most situations where inflammatory condition were modelled, the outcome of irradiation exposure was anti-inflammatory [33–35, 55, 56]. In vitro, low dose irradiation increased endothelial expression of ICAM-1 when delivered in fractionated episodes [57], and low dose irradiation activated immune cells, orienting macrophages towards a pro-inflammatory phenotype [58]. However, low dose irradiation also

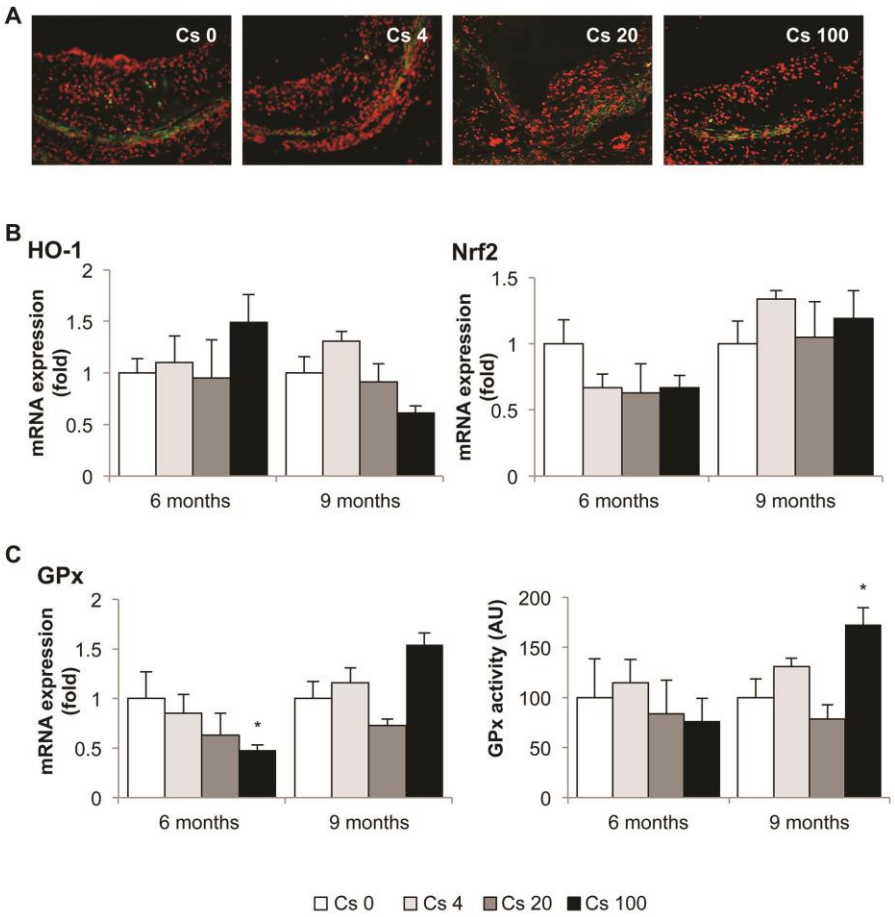


Fig 8. Changes in oxidative stress and related enzyme expression after 6 or 9 months exposure to ^{137}Cs. A: Representative images of superoxide production within the atheromatous plaques evaluated by DHE staining after 9 months exposition (magnification x 200). n = 5 sections per animal. B: Qualitative analyses did not revealed any differences in aortic mRNA expression of HO-1 or Nrf2 between exposed or non-exposed groups, measured by RT-qPCR. C: However, aortic mRNA expression of GPx was reduced at 6 months in animals exposed to 100 kBq/l ^{137}Cs. Moreover, GPx activity was significantly increased at 9 months, compared with non-exposed animals. Results are expressed as mean ± SEM of n = 5–8 animals per group per time. *p<0.05 vs Cs 0 control group.

doi:10.1371/journal.pone.0128539.g008

decreased inflammatory cytokine production, reduced migration, and increased chemotaxis in macrophages, all of which could be linked to resolution of inflammation [59]. In summary, although some in vitro studies tend to link irradiation with pro-inflammatory processes, most animals studies describe a protective effect of low-dose radiation in the setting of inflammatory disease.

To the best of our knowledge, this is the first work investigating the effects of a chronic internal low dose exposure to ^{137}Cs on atherosclerosis development and progression. In comparison, our study demonstrated that chronic, low-dose ^{137}Cs induced no significant modifications in atherosclerotic plaque size. Our results are in line with those of *Mitchel et al* [54]. They reported that a certain dose given at a low dose-rate (1 mGy/min) is protective against atherosclerotic lesion development whereas the same dose given at a high dose-rate (150 mGy/min) increases plaque size at late stages of the pathology. The importance of the dose-rate even after chronic low-dose exposure was confirmed in a model of premature senescence in cultured endothelial cells [60]. Interestingly, the dose-rate during internal contamination, the chosen route of exposure in our study, is around 6 μGy/h, which is much lower than that used in previous works.

Our investigation of the effects of chronic ^{137}Cs exposure revealed that indices of inflammation were actually reduced in exposed mice compared with non-exposed mice. Indeed, we observed a decrease in CRP, TNFα, MCP-1, and IFNγ, associated with a decrease in macrophage content within the plaques, after 6 months ^{137}Cs exposure. Many of these effects persisted at 9 months. Our results are in accordance with some reports showing the anti-inflammatory effect of low-dose irradiation [51, 61] and of low dose radiotherapy (<1Gy or fractionated) [62–64]. Moreover, a previous study highlighted that the anti-inflammatory effect of low dose radiotherapy, which reduced adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro in the absence of effects on adhesion molecule expression [65]. However, chronic ingestion of 20 kBq/l had no impact on leukocyte or lymphocyte numbers [38, 53]. In our model, ^{137}Cs exposure diminished expression of ICAM-1, VCAM-1 and E selectin, further contributing to the potential protective effects of exposure. Hence, the reduced levels of macrophages within the plaques of ^{137}Cs-exposed mice was probably due to diminished pro-inflammatory cytokines (CRP, TNFα, MCP-1, IFNγ), but could also be partially explained by a reduction in adhesion molecules. After 9 months, TNFα, ICAM-1 and VCAM-1 expression was still attenuated in exposed mice, but macrophage content no longer differed between Cs-exposed and unexposed mice. This may be ascribed in part to local proliferation on CD68+ cells, as recently demonstrated [66].

In our study, reduced plaque macrophage content after 6 months to ^{137}Cs suggested a potential increase in stability. Interestingly, most clinical manifestations of atherosclerosis are related to plaque instability rather than lesion size. Vulnerable human atherosclerotic plaques are characterized by increased accumulation of macrophages, a large lipid pool, a thin fibrous cap, and decreased smooth muscle cell and collagen content; these plaques are more prone to rupture than stable plaques [67–69]. Plaque rupture is an uncommon occurrence in murine models of atherosclerosis. However many morphologic features of atheroma that are prone to plaque rupture in humans can be seen in murine lesions [70]. Accumulated macrophages not only become foam cells that eventually become major constituents of the necrotic lipid core, they also synthesize and secrete matrix metalloproteinases which destroy collagen and thereby weaken the fibrous cap [10, 71]. Moreover, some reviews have emphasized the role of VSMCs in maintaining the integrity of plaque, in part through collagen synthesis, and suggested that VSMC proliferation may be beneficial to plaque stability [72]. Nevertheless, inflammation can inhibit collagen I and III production [73] and stimulate MMP production [10] by VSMC. In our study, we found that 6 months of ^{137}Cs exposure was associated with reduced inflammatory mediators, lower CD68+ staining, and diminished expression of MMP8 and MMP13. At 9 months, plaque macrophage numbers were equivalent in exposed and non-exposed mice, but VSMC content was enhanced. In parallel, collagen content and collagen gene expression were increased. *Schiller et al* [74] demonstrated macrophage rich and collagen poor lesions in the aortic roots of irradiated LDLR$^{-/-}$ mice after acute high dose (10 Gy) total body irradiation.

Another group [75] also observed a decrease in VSMC and an increase in macrophages, coupled with higher levels of MMP8, in irradiated arteries. Thus, there truly appears to be a dose effect related to beneficial or adverse impacts of radiation on markers of plaque stability. Differences in levels of inflammation may very well underlie the opposite outcomes of high and low radiation exposure.

We hypothesized that changes in oxidative stress levels could account for the lower inflammatory profile of mice after ^{137}Cs exposure. In a model of granulomatous disease, the anti-inflammatory effect of irradiation was correlated with an increase expression of oxidative stress parameters like HO-1 [76]. Similarly, it was shown that low doses of X-rays modulate the oxidative burst, which plays an anti-inflammatory role by reducing activated macrophages [77]. These observations could be attributed to hormesis, whereby a damaging agent causing a mild stress response results in a beneficial effect. Whereas high doses of radioactivity increase oxidative stress and inflammation significantly, low doses on the contrary modulate oxidative stress and inflammation [66, 78, 79]. However, in our experimental model we did not observe any striking difference in oxidative stress parameters after ^{137}Cs exposure. The reduced expression of the anti-oxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) at 6 months was counterbalanced by increased GPx activity at 9 months. Moreover, plaque ROS status, measured by DHE staining, was not altered by ^{137}Cs exposure. Hence, although our results do not discount a potential role for oxidative stress in the anti-atherogenic response to ^{137}Cs at early time points, changes in oxidative stress are unlikely to explain the decreased in pro-inflammatory parameters and reduced macrophage content in plaques observed in mice exposed to ^{137}Cs at 6 and 9 months.

The limitations of the current work include the use of young animals and reliance on the mouse model, in which plaques are not rupture-prone. Nevertheless, our study demonstrates that chronic low dose internal exposure to ^{137}Cs, comparable to what is found in contaminated territories, does not potentiate atherosclerosis progression. On the contrary, we observed that such exposure enhances the stability of atherosclerotic plaques in ApoE$^{-/-}$ mice, by inhibiting the expression of inflammatory cytokines and stimulating accumulation of collagen within the plaques. Further studies will be required to assess how early modification in the plaques of mice exposed to ^{137}Cs may alter lesion composition at later time points, with special consideration for smooth muscle cell content (since VSMCs are the main cell type responsible for collagen synthesis in the plaque [8]) and inflammatory mediator expression (including TGFβ which is both anti-inflammatory and a stimulant of collagen production).

Acknowledgments

The authors wish to thanks V. Joffres and D. Lurmin for secretarial assistance and F. Voyer, T. Loiseau and JM Guischet for expert animal care. V. Buard and C. Strup for their advices for *in situ* zymography analysis. This work was supported by grants from Electricite de France (EDF). Stephanie Lehoux, is the recipient of a Canada Research Chair and is supported by the Canadian Foundation for innovation and the Canadian institutes of health research.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CLG TE SL. Performed the experiments: CLG YP LM TE. Analyzed the data: CLG YP LM TE SL. Contributed reagents/materials/analysis tools: CLG YP LM TE. Wrote the paper: CLG LM ID MB YG SL TE.

References

1. IAEA. Environmental consequences of Chernobyl accident and their remediation: Twenty years of experience. Report of the Chernobyl Forum Expert Group "Environment" (Vienna: IAEA). 2006.

2. ICRP. Dose coefficients for intakes of radionuclides by workers report of a task group of committee 2 of the international commission on radionuclides by workers and task group of committee 2 of the international commission on radiological protection. 1994;ICRP24:1–83.
3. Okishio Y, Niioka S, Takeuchi T, Nishio H, Hata F, Takatsuji K. Differences in mediator of nonadrenergic, noncholinergic relaxation of the distal colon between Wistar-ST and Sprague-Dawley strains of rats. European journal of pharmacology. 2000; 388(1):97–105. Epub 2000/02/05. PMID: 10657552.
4. Kharchenko VP, Rassokhin BM, Zubovskii GA. [Value of bone densitometry in the determination of vertebral mineral density in participants of the clean-up after Chernobyl accident]. Meditsina truda i promyshlennaia ekologiia. 2001;(2:):29–32. Epub 2001/03/29. PMID: 11270148.
5. Vykhovanets EV, Chernyshov VP, Slukvin II, Antipkin YG, Vasyuk A, Colos V. Analysis of blood lymphocyte subsets in children living around Chernobyl exposed long-term to low doses of cesium-137 and various doses of iodine-131. Radiation research. 2000; 153(6):760–72. Epub 2000/05/29. PMID: 10825751.
6. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature. 2002; 420(6917):868–74. Epub 2002/12/20. doi: 10.1038/nature01323 PMID: 12490960.
7. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. Journal of internal medicine. 2000; 247(3):349–58. Epub 2000/04/13. PMID: 10762452.
8. Gorenne I, Kavurma M, Scott S, Bennett M. Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. Cardiovascular research. 2006; 72(1):9–17. Epub 2006/07/11. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.06.004 PMID: 16824498.
9. Burleigh MC, Briggs AD, Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD. Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations. Atherosclerosis. 1992; 96(1):71–81. Epub 1992/09/01. PMID: 1418104.
10. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, et al. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. Circulation research. 1994; 75(1):181–9. Epub 1994/07/01. PMID: 8013077.
11. Cozlea DL, Farcas DM, Nagy A, Keresztesi AA, Tifrea R, Cozlea L, et al. The impact of C reactive protein on global cardiovascular risk on patients with coronary artery disease. Current health sciences journal. 2013; 39(4):225–31. Epub 2014/04/30. PMID: 24778862; PubMed Central PMCID: PMC3945266.
12. Stewart FA, Heeneman S, Te Poele J, Kruse J, Russell NS, Gijbels M, et al. Ionizing radiation accelerates the development of atherosclerotic lesions in ApoE-/- mice and predisposes to an inflammatory plaque phenotype prone to hemorrhage. The American journal of pathology. 2006; 168(2):649–58. Epub 2006/01/27. doi: 10.2353/ajpath.2006.050409 PMID: 16436678; PubMed Central PMCID: PMC1606487.
13. Yu T, Parks BW, Yu S, Srivastava R, Gupta K, Wu X, et al. Iron-ion radiation accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Radiation research. 2011; 175(6):766–73. Epub 2011/04/07. doi: 10.1667/RR2482.1 PMID: 21466380.
14. Hoving S, Heeneman S, Gijbels MJ, te Poele JA, Russell NS, Daemen MJ, et al. Single-dose and fractionated irradiation promote initiation and progression of atherosclerosis and induce an inflammatory plaque phenotype in ApoE(-/-) mice. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2008; 71(3):848–57. Epub 2008/06/03. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.02.031 PMID: 18514779.
15. Kovaleva LI, Liubchenko PN, Basakova TV. [The central hemodynamics of participants in the cleanup of the sequelae of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station 4 years after the accident]. Gigiena truda i professional'nye zabolevaniia. 1992;(3:):15–7. Epub 1992/01/01. PMID: 1427312.
16. Bandazhevskaya GS, Nesterenko VB, Babenko VI, Yerkovich TV, Bandazhevsky YI. Relationship between caesium (137Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in 'Chernobyl' children—preliminary observations after intake of oral apple pectin. Swiss medical weekly. 2004; 134(49–50):725–9. Epub 2005/01/07. doi: 2004/49/smw-10219. PMID: 15635491.
17. Cwikel JG, Goldsmith JR, Kordysh E, Quastel M, Abdelgani A. Blood pressure among immigrants to Israel from areas affected by the Chernobyl disaster. Public health reviews. 1997; 25(3–4):317–35. Epub 1997/01/01. PMID: 9553447.
18. Wong FL, Yamada M, Sasaki H, Kodama K, Hosoda Y. Effects of radiation on the longitudinal trends of total serum cholesterol levels in the atomic bomb survivors. Radiation research. 1999; 151(6):736–46. Epub 1999/06/09. PMID: 10360794.
19. Gaugler MH, Drouet F, Krempf M. [Radiotherapy and atherosclerosis: current data and issues]. Medecine sciences: M/S. 2010; 26(8–9):740–6. Epub 2010/09/08. doi: 10.1051/medsci/2010268-9740 PMID: 20819712.

20. Bilora F, Pietrogrande F, Petrobelli F, Polato G, Pomerri F, Muzzio PC. Is radiation a risk factor for atherosclerosis? An echo-color Doppler study on Hodgkin and non-Hodgkin patients. Tumori. 2006; 92 (4):295–8. Epub 2006/10/14. PMID: 17036519.

21. Wethal T, Nedregaard B, Andersen R, Fossa A, Lund MB, Gunther A, et al. Atherosclerotic lesions in lymphoma survivors treated with radiotherapy. Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2014; 110(3):448–54. Epub 2013/11/16. doi: 10.1016/j.radonc.2013.10.029 PMID: 24231235.

22. Dunsmore LD, LoPonte MA, Dunsmore RA. Radiation-induced coronary artery disease. Journal of the American College of Cardiology. 1986; 8(1):239–44. Epub 1986/07/01. PMID: 3711522.

23. Angelini A, Benciolini P, Thiene G. Radiation-induced coronary obstructive atherosclerosis and sudden death in a teenager. International journal of cardiology. 1985; 9(3):371–3. Epub 1985/11/01. PMID: 4055153.

24. McReynolds RA, Gold GL, Roberts WC. Coronary heart disease after mediastinal irradiation for Hodgkin's disease. The American journal of medicine. 1976; 60(1):39–45. Epub 1976/01/01. PMID: 1251845.

25. Thalhammer C, Husmann M, Glanzmann C, Studer G, Amann-Vesti BR. Carotid artery disease after head and neck radiotherapy. VASA Zeitschrift fur Gefasskrankheiten. 2015; 44(1):23–30. Epub 2014/12/30. doi: 10.1024/0301-1526/a000403 PMID: 25537055.

26. Bashar K, Healy D, Clarke-Moloney M, Burke P, Kavanagh E, Walsh SR. Effects of neck radiation therapy on extra-cranial carotid arteries atherosclerosis disease prevalence: systematic review and a meta-analysis. PloS one. 2014; 9(10):e110389. Epub 2014/10/21. doi: 10.1371/journal.pone.0110389 PMID: 25329500; PubMed Central PMCID: PMC4199672.

27. Gujral DM, Chahal N, Senior R, Harrington KJ, Nutting CM. Radiation-induced carotid artery atherosclerosis. Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2014; 110(1):31–8. Epub 2013/09/21. doi: 10.1016/j.radonc.2013.08.009 PMID: 24044796.

28. Gabriels K, Hoving S, Gijbels MJ, Pol JF, te Poele JA, Biessen EA, et al. Irradiation of existing atherosclerotic lesions increased inflammation by favoring pro-inflammatory macrophages. Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2014; 110(3):455–60. Epub 2014/03/19. doi: 10.1016/j.radonc.2014.01.006 PMID: 24630533.

29. Azizova TV, Muirhead CR, Druzhinina MB, Grigoryeva ES, Vlasenko EV, Sumina MV, et al. Cerebrovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948–1958. Radiation research. 2010; 174(6):851–64. Epub 2010/12/07. doi: 10.1667/RR1928.1 PMID: 21128809.

30. Azizova TV, Muirhead CR, Druzhinina MB, Grigoryeva ES, Vlasenko EV, Sumina MV, et al. Cardiovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948–1958. Radiation research. 2010; 174(2):155–68. Epub 2010/08/05. doi: 10.1667/RR1789.1 PMID: 20681782.

31. Little MP, Tawn EJ, Tzoulaki I, Wakeford R, Hildebrandt G, Paris F, et al. A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms. Radiation research. 2008; 169(1):99–109. Epub 2007/12/28. doi: 10.1667/RR1070.1 PMID: 18159955.

32. Gueguen Y, Lestaevel P, Grandcolas L, Baudelin C, Grison S, Jourdain JR, et al. Chronic contamination of rats with 137 cesium radionuclide: impact on the cardiovascular system. Cardiovascular toxicology. 2008; 8(1):33–40. Epub 2008/03/11. doi: 10.1007/s12012-008-9013-3 PMID: 18327657.

33. Shao M, Lu X, Cong W, Xing X, Tan Y, Li Y, et al. Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress. PloS one. 2014; 9(3):e92574. Epub 2014/03/22. doi: 10.1371/journal.pone.0092574 PMID: 24651118; PubMed Central PMCID: PMC3961432.

34. Zhang C, Jin S, Guo W, Li C, Li X, Rane MJ, et al. Attenuation of diabetes-induced cardiac inflammation and pathological remodeling by low-dose radiation. Radiation research. 2011; 175(3):307–21. Epub 2011/03/11. doi: 10.1667/RR1950.1 PMID: 21388274.

35. Lodermann B, Wunderlich R, Frey S, Schorn C, Stangl S, Rodel F, et al. Low dose ionising radiation leads to a NF-kappaB dependent decreased secretion of active IL-1beta by activated macrophages with a discontinuous dose-dependency. International journal of radiation biology. 2012; 88(10):727–34. Epub 2012/05/02. doi: 10.3109/09553002.2012.689464 PMID: 22545750.

36. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology / American Heart Association. 1994; 14(1):133–40. Epub 1994/01/01. PMID: 8274468.

37. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2004; 24(6):1006–14. Epub 2004/04/17. doi: 10.1161/01.ATV.0000128849.12617.f4 PMID: 15087308.

38. Bertho JM, Louiba S, Faure MC, Tourlonias E, Stefani J, Siffert B, et al. Biodistribution of (137)Cs in a mouse model of chronic contamination by ingestion and effects on the hematopoietic system. Radiation and environmental biophysics. 2010; 49(2):239–48. Epub 2010/02/17. doi: 10.1007/s00411-010-0267-3 PMID: 20157720.

39. Handl J, Beltz D, Botsch W, Harb S, Jakob D, Michel R, et al. Evaluation of radioactive exposure from 137Cs in contaminated areas of Northern Ukraine. Health physics. 2003; 84(4):502–17. Epub 2003/04/23. PMID: 12705449.

40. Hoshi M, Konstantinov YO, Evdeeva TY, Kovalev AI, Aksenov AS, Koulikova NV, et al. Radiocesium in children residing in the western districts of the Bryansk Oblast from 1991–1996. Health physics. 2000; 79(2):182–6. Epub 2000/07/26. PMID: 10910388.

41. Puhakainen M, Heikkinen T, Rahola T. Levels of 90Sr and 137Cs in the urine of Finnish people. Radiation protection dosimetry. 2003; 103(3):255–62. Epub 2003/04/08. PMID: 12678388.

42. Bandazhevsky YI. Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. Swiss medical weekly. 2003; 133 (35–36):488–90. Epub 2003/12/04. doi: 2003/35/smw-10226. PMID: 14652805.

43. Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration. Brain research Developmental brain research. 1998; 108(1–2):39–45. Epub 1998/08/07. PMID: 9693782.

44. Joven J, Rull A, Ferre N, Escola-Gil JC, Marsillach J, Coll B, et al. The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain. Atherosclerosis. 2007; 195(2): e85–92. Epub 2007/07/27. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.06.012 PMID: 17651742.

45. ICRP. The concept and use of reference animals and plants. Publication 108 Environmental protection. 2008;Ann ICRP38(Pergamon press (oxford)):1–242

46. Bertho JM. Absorbed radiation doses due to chronic ingestion of cesium-137 or Strontium-90 by mice. Radioprotection. 2012; 47:219–30.

47. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4):402–8. Epub 2002/02/16. doi: 10.1006/meth.2001.1262 PMID: 11846609.

48. Daugherty A, Whitman SC. Quantification of atherosclerosis in mice. Methods Mol Biol. 2003; 209:293–309. Epub 2002/10/03. PMID: 12357958.

49. Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. The American journal of pathology. 2000; 157(6):1819–24. Epub 2000/12/07. PMID: 11106554; PubMed Central PMCID: PMC1885762.

50. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. Physiological reviews. 2005; 85(1):1–31. Epub 2004/12/25. doi: 10.1152/physrev.00048.2003 PMID: 15618476.

51. Arenas M, Sabater S, Hernandez V, Rovirosa A, Lara PC, Biete A, et al. Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy. Indications, dose, and radiobiological mechanisms involved. Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]. 2012; 188(11):975–81. Epub 2012/08/22. doi: 10.1007/s00066-012-0170-8 PMID: 22907572.

52. Dublineau I, Grison S, Grandcolas L, Baudelin C, Paquet F, Voisin P, et al. Effects of chronic 137Cs ingestion on barrier properties of jejunal epithelium in rats. Journal of toxicology and environmental health Part A. 2007; 70(10):810–9. Epub 2007/04/25. doi: 10.1080/15287390701209113 PMID: 17454557.

53. Bertho JM, Faure MC, Louiba S, Tourlonias E, Stefani J, Siffert B, et al. Influence on the mouse immune system of chronic ingestion of 137Cs. Journal of radiological protection: official journal of the Society for Radiological Protection. 2011; 31(1):25–39. Epub 2011/02/25. doi: 10.1088/0952-4746/31/1/001 PMID: 21346294.

54. Mitchel RE, Hasu M, Bugden M, Wyatt H, Little MP, Gola A, et al. Low-dose radiation exposure and atherosclerosis in ApoE(-)/(-) mice. Radiation research. 2011; 175(5):665–76. Epub 2011/03/08. doi: 10.1667/RR2176.1 PMID: 21375359.

55. Park BS, Hong GU, Ro JY. Foxp3(+)-Treg cells enhanced by repeated low-dose gamma-irradiation attenuate ovalbumin-induced allergic asthma in mice. Radiation research. 2013; 179(5):570–83. Epub 2013/04/09. doi: 10.1667/RR3082.1 PMID: 23560633.

56. Frey B, Gaipl US, Sarter K, Zaiss MM, Stillkrieg W, Rodel F, et al. Whole body low dose irradiation improves the course of beginning polyarthritis in human TNF-transgenic mice. Autoimmunity. 2009; 42 (4):346–8. Epub 2009/10/09. PMID: 19811297.

57. Cervelli T, Panetta D, Navarra T, Andreassi MG, Basta G, Galli A, et al. Effects of single and fractionated low-dose irradiation on vascular endothelial cells. Atherosclerosis. 2014; 235(2):510–8. Epub 2014/06/24. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.932 PMID: 24953491.

58. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, et al. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS(+)/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. Cancer cell. 2013; 24(5):589–602. Epub 2013/11/12. doi: 10.1016/j.ccr.2013.09.014 PMID: 24209604.

59. Wunderlich R, Ernst A, Rodel F, Fietkau R, Ott O, Lauber K, et al. Low and moderate doses of ionizing radiation up to 2 Gy modulate transmigration and chemotaxis of activated macrophages, provoke an anti-inflammatory cytokine milieu, but do not impact upon viability and phagocytic function. Clinical and experimental immunology. 2015; 179(1):50–61. Epub 2014/04/16. doi: 10.1111/cei.12344 PMID: 24730395; PubMed Central PMCID: PMC4260896.

60. Yentrapalli R, Azimzadeh O, Barjaktarovic Z, Sarioglu H, Wojcik A, Harms-Ringdahl M, et al. Quantitative proteomic analysis reveals induction of premature senescence in human umbilical vein endothelial cells exposed to chronic low-dose rate gamma radiation. Proteomics. 2013; 13(7):1096–107. Epub 2013/01/26. doi: 10.1002/pmic.201200463 PMID: 23349028.

61. Kataoka T. Study of antioxidative effects and anti-inflammatory effects in mice due to low-dose X-irradiation or radon inhalation. Journal of radiation research. 2013; 54(4):587–96. Epub 2013/02/20. doi: 10.1093/jrr/rrs141 PMID: 23420683; PubMed Central PMCID: PMC3709669.

62. von Pannewitz G. [Radiotherapy of arthrosis deformans. Method and results]. Der Radiologe. 1970; 10 (2):51–4. Epub 1970/02/01. PMID: 5422687.

63. Trott KR, Parker R, Seed MP. [The effect of x-rays on experimental arthritis in the rat]. Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]. 1995; 171(9):534–8. Epub 1995/09/01. PMID: 7570302.

64. Hildebrandt G, Radlingmayr A, Rosenthal S, Rothe R, Jahns J, Hindemith M, et al. Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats. International journal of radiation biology. 2003; 79(12):993–1001. Epub 2004/01/10. doi: 10.1080/09553000310001636639 PMID: 14713577.

65. Kern PM, Keilholz L, Forster C, Hallmann R, Herrmann M, Seegenschmiedt MH. Low-dose radiotherapy selectively reduces adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro. Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2000; 54(3):273–82. Epub 2000/03/30. PMID: 10738086.

66. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. Nature medicine. 2013; 19(9):1166–72. Epub 2013/08/13. doi: 10.1038/nm.3258 PMID: 23933982; PubMed Central PMCID: PMC3769444.

67. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2000; 20(5):1262–75. Epub 2000/05/16. PMID: 10807742.

68. Aikawa M, Libby P. Lipid lowering therapy in atherosclerosis. Seminars in vascular medicine. 2004; 4 (4):357–66. Epub 2005/04/30. doi: 10.1055/s-2004-869592 PMID: 15861316.

69. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005; 25(10):2054–61. Epub 2005/07/23. doi: 10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18 PMID: 16037567.

70. Falk E, Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME. Neointimal cracks (plaque rupture?) and thrombosis in wrapped arteries without flow. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2007; 27(1):248–9; author reply 50–2. Epub 2006/12/23. doi: 10.1161/01.ATV.0000249644.86759.81 PMID: 17185623.

71. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. The Journal of clinical investigation. 1994; 94(6):2493–503. Epub 1994/12/01. doi: 10.1172/JCI117619 PMID: 7989608; PubMed Central PMCID: PMC330083.

72. Weissberg PL, Clesham GJ, Bennett MR. Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial? Lancet. 1996; 347(8997):305–7. Epub 1996/02/03. PMID: 8569368.

73. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology / American Heart Association. 1991; 11(5):1223–30. Epub 1991/09/01. PMID: 1911708.

74. Schiller NK, Black AS, Bradshaw GP, Bonnet DJ, Curtiss LK. Participation of macrophages in atherosclerotic lesion morphology in LDLr-/- mice. Journal of lipid research. 2004; 45(8):1398–409. Epub 2004/06/04. doi: 10.1194/jlr.M400036-JLR200 PMID: 15175354.

75. Pakala R, Leborgne L, Cheneau E, Chan RC, Yazdi H, Fournadjiev J, et al. Radiation-induced atherosclerotic plaque progression in a hypercholesterolemic rabbit: a prospective vulnerable plaque model? Cardiovascular radiation medicine. 2003; 4(3):146–51. Epub 2004/02/27. doi: 10.1016/S1522-1865(03)00182-3 PMID: 14984715.

76. Hildebrandt G, Seed MP, Freemantle CN, Alam CA, Colville-Nash PR, Trott KR. Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy. International journal of radiation biology. 1998; 74(3):367–78. Epub 1998/09/16. PMID: 9737539.

77. Schaue D, Marples B, Trott KR. The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages. International journal of radiation biology. 2002; 78(7):567–76. Epub 2002/06/25. doi: 10.1080/09553000210126457 PMID: 12079535.

78. Randolph GJ. Proliferating macrophages prevail in atherosclerosis. Nature medicine. 2013; 19 (9):1094–5. Epub 2013/09/10. doi: 10.1038/nm.3316 PMID: 24013746.

79. Calabrese EJ, Stanek EJ 3rd, Nascarella MA. Evidence for hormesis in mutagenicity dose-response relationships. Mutation research. 2011; 726(2):91–7. Epub 2011/05/05. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.04.006 PMID: 21540124.

ANNEXE II

RADIATION RESEARCH **183**, 000–000 (2014)
0033-7587/14 $15.00
©2014 by Radiation Research Society.
All rights of reproduction in any form reserved.
DOI: 10.1667/RR13732.1

Chronic Gamma-Irradiation Induces a Dose-Rate-Dependent Pro-inflammatory Response and Associated Loss of Function in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

T. Ebrahimian,[a,1] C. Le Gallic,[a] J. Stefani,[a] I. Dublineau,[a] R. Yentrapalli,[b] M. Harms-Ringdahl[c] and S. Haghdoost[c]

[a] IRSN: Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, Service de Radiobiologie et d'Épidémiologie, Laboratoire de RadioToxicologie Experimentale, 92262, Fontenay-aux-Roses, France; [b] Institute of Radiation Biology, Helmholtz Zentrum Munchen, German Research Centre for Environmental Health, Neuherberg, Germany; and [c] Centre for Radiation Protection Research, Department Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, 106 91 Stockholm, Sweden

Ebrahimian, T., Le Gallic, C., Stefani, J., Dublineau, I., Yentrapalli, R., Harms-Ringdahl, M. and Haghdoost, S. Chronic Gamma-Irradiation Induces a Dose-Rate-Dependent Pro-inflammatory Response and Associated Loss of Function in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Radiat. Res.* 183, 000–000 (2014).

A central question in radiation protection research is dose and dose-rate relationship for radiation-induced cardiovascular diseases. The response of endothelial cells to different low dose rates may contribute to help estimate risks for cardiovascular diseases by providing mechanistic understanding. In this study we investigated whether chronic low-dose-rate radiation exposure had an effect on the inflammatory response of endothelial cells and their function. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were chronically exposed to radiation at a dose of 1.4 mGy/h or 4.1 mGy/h for 1, 3, 6 or 10 weeks. We determined the pro-inflammatory profile of HUVECs before and during radiation exposure, and investigated the functional consequences of this radiation exposure by measuring their capacity to form vascular networks in matrigel. Expression levels of adhesion molecules such as E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1, and the release of pro-inflammatory cytokines such as MCP-1, IL-6 and TNF-α were analyzed. When a total dose of 2 Gy was given at a rate of 4.1 mGy/h, we observed an increase in IL-6 and MCP-1 release into the cell culture media, but this was not observed at 1.4 mGy/h. The increase in the inflammatory profile induced at the dose rate of 4.1 mGy/h was also correlated with a decrease in the capacity of the HUVECs to form a vascular network in matrigel. Our results suggest that dose rate is an important parameter in the alteration of HUVEC inflammatory profile and function. © 2014 by Radiation Research Society

[1] Address for correspondence: Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de RadioToxicologie Expérimentale, 92262, Fontenay-aux-Roses, France; e-mail: teni.ebrahimian@irsn.fr.

INTRODUCTION

Although the mechanisms are not completely known, the risk for cardiovascular diseases associated with high or medium doses over a few Gy of ionizing radiation are well established. For doses such as those used in radiotherapy, a variety of effects are observed, i.e., deterministic effects or tissue reactions are observed, resulting from cell death or premature senescence and associated functional impairment of the affected tissue. Epidemiological and animal data suggest a causality between high radiation dose exposure delivered acutely and the development of cardiovascular disease (*1–3*). While mechanisms of the effects of medium-dose exposure on cardiovascular disease relevant to radiotherapy have been thoroughly reviewed (*4*), the effects of low-dose and low-dose-rate exposure on the development of cardiovascular diseases are still unclear and remain a high priority for radiation protection research. Recently, Little *et al.* published a review on the effects of radiation on circulatory diseases with a focus on the possible effects of lower doses (*5*). One of the main areas of concern discussed was whether and how low dose exposure might elevate the risk of cardiovascular disease, as reported by some epidemiological studies, and if implicated mechanisms at low-dose differ from high-dose effects. Low-dose-rate exposure has been reported to be protective (*6*), whereas high-dose-rate exposure is associated with detrimental effects (*7*), suggesting that low doses may influence this disease by more than one mechanism and that the dose rate is an important parameter.

It is well known that inflammation is the driving force in vascular pathologies (*8, 9*) and strong evidence supports the central role of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, MCP-1 and TNF-α in vascular diseases. After lipid trans-endothelialization within the intima and their oxidation, inflammatory cells excrete cytokines. These cytokines can cause an increase of adhesion molecules on the cell surface such as ICAM-1, VCAM-1 or E-selectins inducing HUVEC dysfunction in terms of senescence induction or loss of

function (*10*). Importantly, at sites overlying atherosclerosis sites, loss of endothelial cell function has been observed in the human aorta and coronary arteries (*11, 12*). Indeed, inflammation, atherosclerosis and angiogenesis appear to be interconnected and, under hypoxic conditions, angiogenesis is directly enhanced by chemokines (*13, 14*).

In fact, endothelial cells (ECs), known to be critical targets for radiation injury, appear to play a key role in the development of vascular pathologies. At the cellular level, the effects of radiation have been studied with diverse endothelial models and methods with regards to endothelial barrier damage or permeability change (*15, 16*), cytoskeleton disruption (*17, 18*), angiogenic capacity impediment (*19, 20*) and premature senescence (*21, 22*).

It has been shown that depending on the dose, radiation activates either endothelial cells (*23, 24*) or induces loss of endothelial cells by apoptosis (*25–27*). Endothelial cell adhesion molecules are involved in a number of cell adhesion processes that occur in the vasculature, such as adhesion and transendothelial migration of leukocytes and endothelial cell adhesion and migration (*28, 29*). In fact, the endothelium is considered to be a dynamic organ with secretory, metabolic and immunological roles.

The long-term effects of radiation exposure may also need to be considered since recent studies suggest that persistent endothelial dysfunction could play a key role in the pathogenesis of radiation-induced tissue injury (*30, 31*). There have been reports of an upregulation of adhesion molecule expression after gamma irradiation, which impairs functionality of both human macro and micro-vascular endothelial cells from different tissues (*7, 32, 33*). IL-6, TNF-α and MCP-1 are potent pro-inflammatory cytokines that are released from damaged tissue and cause the activation of the vascular endothelium. This activation results in the expression of a variety of cell surface adhesion molecules mediating leukocyte migration through the vascular endothelium. Currently, three families of adhesion molecules, selectin immunoglobulin and integrin families have been well characterized and have shown to be important in inflammation (*12*). E-selectin promotes adhesion of neutrophils, monocytes and a subpopulation of lymphocyte to leukocyte interactions with glycoprotein ligands on leukocytes. Indeed, E-selectin allows cell-to-cell adhesion (*34*).

A recent study by Yentrapalli *et al.* (*22, 35*) has shown that chronic exposure to low-dose-rate ionizing radiation triggers a premature senescence program in primary human endothelial cells. In this study, the cells showed a progressive loss of replicative capacity when the cumulative dose reached 4 Gy. Moreover, Rombout *et al.* (*36*) showed that low doses (0.05 Gy) induced subtle increases in DNA double-strand breaks in HUVECs compared to high doses. This study also showed increased apoptosis in HUVECs that were exposed to doses as low as 0.5 Gy. However, to our knowledge there is no study describing the effects of chronic exposure to low-dose radiation with a range of low-dose rates on the HUVEC inflammatory profile and angiogenic function.

The aim of this study was to investigate the pro-inflammatory response of HUVECs exposed to chronic low-dose radiation and the functional consequences. HUVECs were chronically exposed to radiation at different low dose rates (1.4 mGy/h and 4.1 mGy/h) for 1, 3, 6 or 10 weeks. Expression of pro-inflammatory adhesion molecules, release of pro-inflammatory cytokines and HUVECs angiogenic function were measured.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture Conditions and Cell Growth Kinetics

Primary culture of HUVEC (Invitrogen™, Paisley, UK) was obtained from a single donor. The HUVECs were cultured and expanded for 7 days, detached by Accutase® (Invitrogen) and then frozen at −120°C in 2 ml cryotubes with one million cells per tube in media with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). Prior to each experiment, the cells from the three cryotubes were thawed and cultured in an incubator while exposed to chronic low dose rates. The incubator was equipped with ^{137}Cs source. The cell culture media was composed of Medium 200 (Invitrogen) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), 1 μg/μL hydrocortisone, 10 ng/mL epidermal growth factor, 10 μg/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin. The cells were cultured in a cell culture incubator at 37°C in a 95% air/5% CO_2 humidified atmosphere. Cells were passaged every seven days (5,000 cells/cm^2) and culture media was changed every second day. Cells were passaged using Accutase for detachment.

Chronic Gamma-Radiation Exposure

For chronic exposure (1.4 and 4.1 mGy/h) a cell culture incubator equipped with ^{137}Cs sources (CRPR, Stockholm University) was used. To evaluate the mechanisms that occur in endothelial cells exposed to low-dose radiation, *in vitro* experiments were performed by chronically exposing HUVECs to gamma radiation at different dose rates (1.4 and 4.1 mGy/h) until cells entered senescence. The chronic dose rates used in the experiments yield a total dose listed in the text. For example the total dose for 1 week at 1.4 mGy/h = $1.4 \times 24 \times 7 =$ 0.24 Gy. This goes for all the dose-rate total dose calculations. Indeed, the cumulative radiation doses at these time points (1, 3, 6 and 10 weeks) for 1.4 mGy/h were 0.24, 0.71, 1.41 and 2.3 Gy, respectively. For 4.1 mGy/h the cumulative radiation doses were 0.69, 2.1, 4.1 and 6.9 Gy, respectively.

Cell samples were collected at different time points (1, 3, 6 and 10 weeks), and kept at −120°C until analysis. Prior to analysis, the cells were thawed 3 days in media. Media and cells were then harvested and expression of cytokines by ELISA (R&D Systems™, Minneapolis, MN), adhesion molecules by Western blot (Abcam®, Cambridge, UK) and real-time polymerase chain reaction (PCR) were then analyzed.

Immunoblotting Analysis

Protein extracts for HUVECs were obtained by lysing cells in 200 μl of buffer (20% sodium dodecylsulfate, 100 m*M*/L sodium orthovanadate 0.5 *M*/L Tris, pH = 7.4) with protease inhibitors. Proteins were separated in 12% denaturing sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose sheets (Hybond ECL, Amersham, Orsay, France). Antibodies against ICAM-1 (1/500, Abcam) and VCAM-1 (1/200, Abcam) were used for immunoblotting. As a protein loading control, membranes were stripped, incubated with a goat polyclonal antibody directed against total actin (dilution 1/1,000, Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA). After washing three times, blots were incubated with

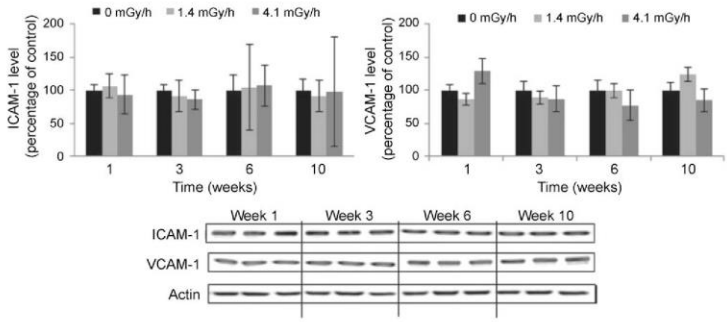


FIG. 1. Representative Western blot and quantitative evaluation of ICAM-1 and VCAM-1 protein level in HUVECs irradiated with 1.4 mGy/h and 4.1 mGy/h during 1, 3, 6 and 10 weeks. Values are mean ± SD, n = 3 per group. $*P < 0.05$ versus untreated HUVECs at the same time.

appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc.) for 1 h at room temperature and developed using ECL system (GE Healthcare, Piscataway, NJ) following standard procedures. Quantification of immunoblot bands was performed on digitized images using ImageQuant software. ICAM-1 and VCAM-1 protein expression in different conditions and times are expressed as mean ± SD. Nonirradiated HUVECs were set at 100%. For each time intergroup comparisons were made using a one-way ANOVA and Student's *t* test.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for IL-6, MCP-1 and TNF-α

After the cells were thawed they were grown for three days and the media was collected from the different conditions. The IL-6, MCP-1 and TNF-α concentrations in samples of conditioned media were measured using human IL-6, MCP-1 and TNF-α immunoassays. For cell culture supernatants, a sensitivity of 5 pg/mL could be achieved. IL-6, MCP-1 and TNF-α concentration in different conditions and times are expressed as mean ± SD. The cytokine concentrations in the media of nonirradiated HUVECs were set at 100%. For each time intergroup comparison are made using a one-way ANOVA and Student's *t* test.

Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNA from HUVECs was extracted using Tri Reagent® solution (Sigma-Aldrich® LLC, St. Louis, MO). RNA quality was checked by measuring the ratio of optical densities at 260 and 280 nm. Real-time PCR was used to analyze the mRNA levels of E-selectin after 1, 3, 6 and 10 weeks of irradiation. Real-time PCR was performed with an ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems®, Courtaboeuf, France) using SYBR® Green (Applied Biosystems). All samples were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to analyze the results (*37*). Sequences for the forward and reverse primers are ATGCAGCGCACAAGGGCAGT and CCCGTGGCACCACACGTCA. E-selectin gene expression in different conditions and times is expressed as mean ± SD. Nonirradiated HUVECs were set at 1. For each time point intergroup comparisons were made using a one-way ANOVA and Student's *t* tests.

Vascular Network Formation: Matrigel

The function of HUVECs after irradiation was assessed by measuring their capacity to form vascular networks on matrigel, a gelatinous protein mixture that was introduced onto the culture plates. When HUVECs create intricate spiderweb-like networks on a matrigel-coated surface, this is highly suggestive of the presence of vascular capillary systems. Three days after thawing the HUVEC samples irradiated under different dose rates, the cells were harvested and 100,000 cells per well were pipetted into different culture dishes containing matrigel. The quantification of network formation was measured in terms of the number of branches per site. Ten different sites per condition were counted. The number of branches per site in different conditions and time points is expressed as mean ± SD. Nonirradiated HUVECs were set at 100%. For each time point intergroup comparisons were made using a one-way ANOVA and Student's *t* tests.

Statistical Analysis

All values are mean ± SD. Statistical analysis for the *in vitro* experiments were performed using ANOVA and Student's *t* tests. A probability value of $P \leq 0.05$ was set for considering differences to be statistically significant.

RESULTS

ICAM-1 and VCAM-1 Expression is Unchanged in any Conditions

We evaluated protein expression levels of the cell surface proteins ICAM-1 and VCAM-1 after exposure to low-dose-rate gamma radiation for different periods of time (Fig. 1). Expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 were unchanged for all time points and for all dose rates investigated.

E-selectin is Temporarily Upregulated after Three Weeks of Chronic Irradiation with 4.1 mGy/h

We then determined the E-selectin mRNA level, and observed a significant increase in E-selectin at 6 weeks after 4.1 mGy/h irradiation compared to nonirradiated cells or cells irradiated with 1.4 mGy/h (1.4- and 1.75-fold, respectively) (Fig. 2). After 10 weeks of irradiation we did not observe any difference in E-selectin expression in any groups.

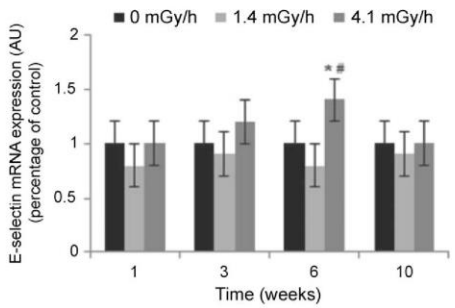


FIG. 2. The gene expression of E-selectin was measured in HUVECs irradiated with 1.4 mG/h and 4.1 mGy/h during 1, 3, 6 and 10 weeks. Values are mean ± SD, n = 3 per group. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ versus untreated HUVECs at the same time.

MCP-1 and IL-6 are Upregulated in a Dose-Rate-Dependent Manner

We quantified cytokine release in the supernatant of irradiated HUVECs under different conditions. TNF-α expression increased significantly when the dose reached 6.9 Gy after 10 weeks of exposure to 4.1 mGy/h compared to nonirradiated HUVECs or HUVECs irradiated with 1.4 mGy/h (2- and 3.9-fold, respectively) (Fig. 3A).

IL-6 expression is increased in a dose-rate-dependent manner. Indeed, IL-6 expression in the medium of HUVECs, when the cumulative dose reached 2 Gy after 3 weeks of exposure to 4.1 mGy/h, was significantly increased compared to nonirradiated HUVECs or HUVECs exposed to 1.4 mGy/h for 3 weeks (2- and 2.05-fold, respectively). Whereas with the same 2 Gy dose after 10 weeks of exposure to 1.4 mGy/h we did not observe any significant increase in IL-6 expression compared to nonirradiated HUVEC at the same time point. After 6 weeks, IL-6 release in the media was unchanged in all of the conditions. However, 10 weeks of 4.1 mGy/h irradiation significantly increased the release of IL-6 in the media compared to nonirradiated HUVECs (twofold) (Fig. 3B).

Similarly, MCP-1 expression is increased in a dose-rate-dependent manner. MCP-1 expression in the medium of HUVECs, when the cumulative dose reached 2 Gy after 3 weeks of exposure to 4.1 mGy/h, was significantly increased compared to nonirradiated HUVECs or HUVECs irradiated with 1.4 mGy/h for 3 weeks (1.82- and 1.77-fold, respectively). Conversely, with the same 2 Gy dose after 10 weeks exposure to 1.4 mGy/h, we did not observe any significant increase in MCP-1 expression compared to nonirradiated HUVECs at the same time point. MCP-1 is not increased in a dose-dependent manner because we did not observe any difference in MCP-1 release after 6 or 10 weeks in any condition (Fig. 3C).

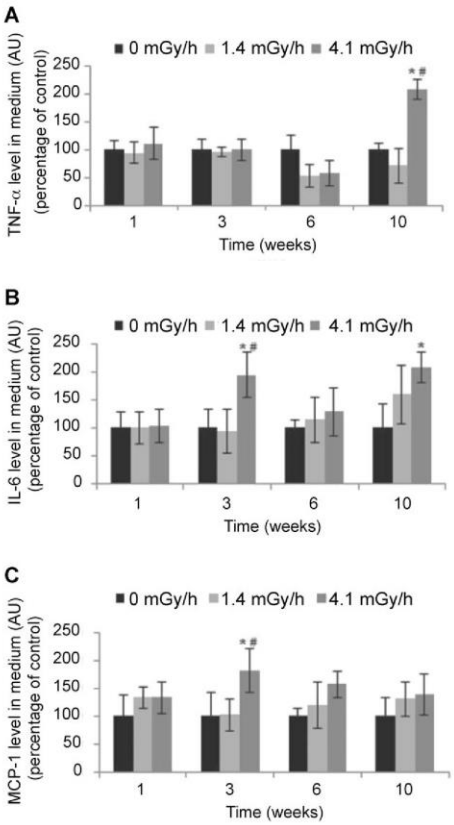


FIG. 3. Cytokine release (TNF-α, IL-6 and MCP-1) in media of HUVECs irradiated with 1.4 mGy/h and 4.1 mGy/h during 1, 3, 6 and 10 weeks was measured with enzyme linked immunosorbent assay kits 3 days after HUVEC thawing in different conditions. Values are mean ± SD, n = 3 per group. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ versus untreated HUVEC at the same time. $^{\#}P < 0.05$; $^{\#\#}P < 0.01$ versus HUVECs irradiated with 1.4 mGy/h.

Reduction in HUVECs Capacity to Form Vascular Networks is Dose-Rate Dependent

To investigate if the increase in pro-inflammatory molecules induced by chronic low-dose irradiation affected HUVEC function, we evaluated their capacity to form vascular networks in matrigel. The results showed a dose-rate dependency. In fact, the number of branches per site when the cumulative dose reached 2 Gy after 3 weeks of exposure to 4.1 mGy/h was significantly decreased compared to nonirradiated HUVECs (1.55-fold). However, with the same 2 Gy dose after 10 weeks of exposure to 1.4 mGy/h we did not observe any significant decrease in HUVEC branching in irradiated

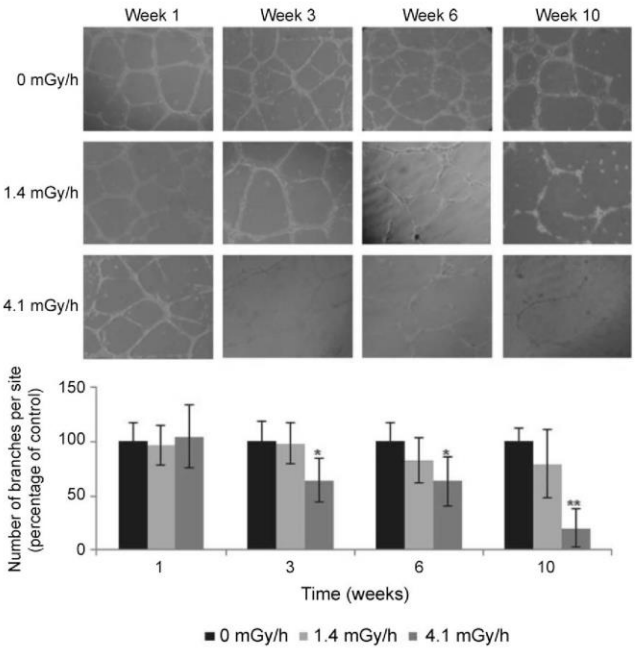


FIG. 4. Functionality of HUVECs was measured by their capacity to form vascular networks on matrigel. The same number of cells was dispatched in different culture dishes with matrigel. The number of branches per site and 10 sites per condition were counted. Data are presented as mean ± SD, n = 3 per group. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ and $***P < 0.01$ versus untreated HUVECs at the same time.

cells compared to nonirradiated HUVECs at the same time point.

The decrease in HUVEC function is also dose dependent at the highest dose rate with the number of branches per site decreased as the cumulative dose increased. We also observed a significant decrease in the number of branches per site in HUVECs that were irradiated for 6 or 10 weeks compared to nonirradiated HUVECs at 6 or 10 weeks, respectively (1.5- and 5-fold, respectively) (Fig. 4).

DISCUSSION

In this study, to the best of our knowledge, we show for the first time that exposure to chronic low-dose-rate ionizing radiation triggers a loss of function of primary HUVECs in a dose-rate and dose-dependent manner. The cells showed a loss of their angiogenic ability when the cumulative dose from chronic exposure to 4.1 mGy/h reached 2 Gy. Exposure to 1.4 mGy/h did not significantly change the ability to form vascular tubular network, even at the 10 week time point when the accumulated dose had reached 2.3 Gy. The dose-rate-dependent loss of ability to form a vascular network is correlated with the increase in IL-6 and MCP-1 release. These results demonstrate the importance of dose rate after low-dose exposure and the presence of a threshold after low-dose exposure of 2 Gy in irradiated primary HUVECs.

Expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 were unchanged for all time points and for both dose rates. The absence of effect on the expression of ICAM-1 and VCAM-1 could be related to the sampling time. Indeed, Hallahan *et al.* (*38*) reported found an increase in ICAM-1 24 h after an acute irradiation and Gaugler *et al.* (*24*) found an increase after 48 h. The low dose rate of chronic exposures used in this study could hypothetically trigger alternative response pathways such as adaptive responses causing upregulation of anti-inflammatory processes.

During endothelial cell inflammatory processes other adhesion molecules such as E-selectin are upregulated to promote adhesion of pro-inflammatory cells such as macrophages on the surface of the endothelium. We observed a significant increase in E-selectin after 6 weeks of exposure to high-dose-rate radiation. This result is in agreement with reports that showed an increase in E-selectin expression on HUVECs after exposure to 0.5 Gy of radiation (*39, 40*). In contrast, Gaugler *et al.* did not observe any increase of E-selectin expression in HUVECs after 2 days of exposure. Furthermore, E-selectin is involved

in the development and progression of atherosclerosis, and a recent study by Mitchel *et al.* (*16*) showed the importance of the dose rate of irradiation on the late stages of atherosclerosis.

The upregulation of adhesion molecules on HUVECs is often mediated by cytokines present or released at the inflammatory site. To determine if low-dose irradiation affects cytokine release we evaluated pro-inflammatory cytokine levels in the supernatant of HUVECs exposed to different exposure dose rates at different time points. After irradiation at a high dose rate we found an increase of MCP-1 and IL-6 when chronically exposed for 6 and 10 weeks and soluble inflammatory mediators (cytokines, chemokines) could act in a paracrine manner to further activate receptors on the surface of the endothelium. It has been shown that inflammatory mediators such as IL-6, TNF-α and MCP-1 are released after irradiation (*41, 42*) and activate endothelial cells. The local response of endothelial cells to the injury may result in the release of pro-inflammatory factors into the systemic circulation, contributing to systemic dysfunction and/or activation of endothelial cells in organs distant to the original insult. The increase in MCP-1 release suggests an increase of the inflammatory process specifically by recruitment of macrophages, since MCP-1 is the major chemoattractant of macrophages. There is contradictory data regarding the influence of IL-6 on the adhesion process of endothelial cells. Podor *et al.* (*43*) examined the production of IL-6 in HUVECs stimulated by TNF-α and in their experiments IL-6 expression had no detectable influence on several endothelial cell functions. However, Watson *et al.* (*44*) reported that treatment of HUVECs with IL-6 increased the yields of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1. Our results, which suggest a dose-rate-dependent increase in inflammatory cytokines after low doses, are in line with the recent study by Mitchel *et al.* (*16*) on the increase in atherosclerosis progression after exposure to a high dose rate compared to low dose rate in an *in vivo* model. Moreover it has been shown that radiation-induced senescence-associated secretory phenotype resulted in the expression of many important inflammatory cytokines such as IFN-γ, TGF-β, and several interleukins and chemokines, and that other secretory proteins showed increased expression in the irradiated cells (*45, 46*).

To determine if the increase in cytokine release with high dose rate could influence endothelial cell function we investigated their capacity to form vascular networks in matrigel, which is an index of their angiogenic function. The results showed that after 3 weeks of high-dose-rate irradiation, the number of branches per site was decreased compared to nonirradiated cells. This effect is dose-rate dependent because no significant decrease was observed on HUVECs irradiated at the same dose but with low dose rate. There was an inverse relationship between the dose rate and the number of branches per site. A few reports have shown that the rate of capillary growth declined in endothelial cells *in vitro* because of increased IL-1α (*47*) or TNF-α (*48*). Donneys *et al.* (*49*) have recently shown that acute irradiation with low doses increases cellular movement and organization, whereas with high doses endothelial cells form fewer tubules in culture. In their study, time-lapse recording demonstrated a considerable increase in cellular organization, activity and locomotion in response to this low-dose therapy. They have also shown that the peak times for angiogenesis and consolidation were significantly reduced with high-dose irradiation. Furthermore, Yentrapalli *et al.* recently showed that with a dose of 4.1 mGy/h, HUVECs enter into senescence, which is a cause of vascular alteration. Moreover, a recent report showed a correlation between acute exposure to 2 or 4 Gy and a loss of endothelial cell tube length in the matrigel and an increase in inflammatory cytokines (*50*). During endothelial cell loss, it is well known that inflammation participates to restore and increase the angiogenic process (*46*). In our *in vitro* model, the loss of tubular network is correlated with an increase of cytokines, although we suspect that the observation time was insufficient to restore tubular network *in vitro*.

The current study shows that chronic exposure to ionizing radiation decreases HUVEC angiogenic function in terms of capacity to form vascular networks in matrigel. This is correlated with an increase in IL-6 and MCP-1 release with high-dose-rate irradiation. In contrast, chronic irradiation does not affect expression of ICAM-1 and VCAM-1 on the surface of HUVECs. The same dose given at a high dose rate could have a detrimental effect on cells whereas with a low dose rate no detrimental effect was observed. This study shows the importance of the dose rate during exposure to ionizing radiation even in a low-dose range. This study could be further extended by investigating the effects of low dose and dose rate on other HUVEC functions such as adhesion to inflammatory cells and migration.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge financial support of DoReMi and Fatoumata Sokhona for technical assistance.

Received: March 3, 2014; accepted: September 3, 2014; published online: 00 00, 00

REFERENCES

1. Azizova TV, Muirhead CR, Druzhinina MB, Grigoryeva ES, Vlasenko EV, Sumina MV, et al. Cerebrovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948–1958. Radiat Res 2010; 174:851–64.
2. Azizova TV, Muirhead CR, Druzhinina MB, Grigoryeva ES, Vlasenko EV, Sumina MV, et al. Cardiovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948–1958. Radiat Res 2010; 174:155–68.
3. Stewart FA, Hoving S, Russell NS. Vascular damage as an underlying mechanism of cardiac and cerebral toxicity in irradiated cancer patients. Radiat Res 2010; 174:865–9.
4. Schultz-Hector S, Trott KR. Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data? Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007; 67:10–8.

5. Little MP, Tawn EJ, Tzoulaki I, Wakeford R, Hildebrandt G, Paris F, et al. A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms. Radiat Res 2008; 169:99–109.
6. Mitchel RE, Hasu M, Bugden M, Wyatt H, Little MP, Gola A, et al. Low-dose radiation exposure and atherosclerosis in ApoE(–)/(–) mice. Radiat Res 2011; 175:665–76.
7. Gaugler MH, Squiban C, Mouthon MA, Gourmelon P, van der Meeren A. Irradiation enhances the support of haemopoietic cell transmigration, proliferation and differentiation by endothelial cells. Br J Haematol 2001; 113:940–50.
8. Bilato C, Crow MT. Atherosclerosis and the vascular biology of aging. Aging (Milano) 1996; 8:221–34.
9. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 2005; 352:1685–95.
10. Herrera MD, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update. Ageing Res Rev 2010; 9:142–52.
11. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. Circulation 2002; 105:1541–4.
12. Merat S, Fruebis J, Sutphin M, Silvestre M, Reaven PD. Effect of aging on aortic expression of the vascular cell adhesion molecule-1 and atherosclerosis in murine models of atherosclerosis. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2000; 55:B85–94.
13. Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albini A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. Cancer Metastasis Rev 2008; 27:31–40.
14. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. Mutat Res 2008; 659:15–30.
15. Young EF, Smilenov LB. Impedance-based surveillance of transient permeability changes in coronary endothelial monolayers after exposure to ionizing radiation. Radiat Res 2011; 176:415–24.
16. Fauquette W, Amourette C, Dehouck MP, Diserbo M. Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study. Brain Res 2012; 1433:114–26.
17. Gabrys D, Greco O, Patel G, Prise KM, Tozer GM, Kanthou C. Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007; 69:1553–62.
18. Kapitonova MY, Muid S, Froemming GR, Yusoff WN, Othman S, Ali AM, et al. Real space flight travel is associated with ultrastructural changes, cytoskeletal disruption and premature senescence of HUVEC. Malays J Pathol 2012; 34:103–13.
19. Park MT, Oh ET, Song MJ, Lee H, Park HJ. Radio-sensitivities and angiogenic signaling pathways of irradiated normal endothelial cells derived from diverse human organs. J Radiat Res 2012; 53:570–80.
20. Ungvari Z, Podlutsky A, Sosnowska D, Tucsek Z, Toth P, Deak F, et al. Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebromicrovascular endothelial cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular radiosensitivity. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2013; 68:1443–57.
21. Igarashi K, Miura M. Inhibition of a radiation-induced senescence-like phenotype: a possible mechanism for potentially lethal damage repair in vascular endothelial cells. Radiat Res 2008; 170:534–9.
22. Yentrapalli R, Azimzadeh O, Sriharshan A, Malinowsky K, Merl J, Wojcik A, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway is implicated in the premature senescence of primary human endothelial cells exposed to chronic radiation. PloS One 2013; 8:e70024.
23. Panes J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. Am J Physiol 1995; 269(6 Pt 2):H1955–64.
24. Gaugler MH, Squiban C, van der Meeren A, Bertho JM, Vandamme M, Mouthon MA. Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. Int J Radiat Biol 1997; 72:201–9.
25. Langley RE, Bump EA, Quartuccio SG, Medeiros D, Braunhut SJ. Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells. Br J Cancer 1997; 75:666–72.
26. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. Science 2001; 293:293–7.
27. Milliat F, Francois A, Tamarat R, Benderitter M. Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages. Annales de Cardiologie et d'Angeiologie 2008; 57:139–48.
28. Albelda SM. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. Am J Respir Cell Mol Biol 1991; 4:195–203.
29. Schimmenti LA, Yan HC, Madri JA, Albelda SM. Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, modulates cell migration. J Cell Physiol 1992; 153:417–28.
30. Tyurina YY, Tyurin VA, Kapralova VI, Wasserloos K, Mosher M, Epperly MW, et al. Oxidative lipidomics of gamma-radiation-induced lung injury: mass spectrometric characterization of cardiolipin and phosphatidylserine peroxidation. Radiat Res 2011; 175:610–21.
31. Holler V, Buard V, Gaugler MH, Guipaud O, Baudelin C, Sache A, et al. Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. J Invest Dermatol 2009; 129:1280–91.
32. Quarmby S, Kumar P, Kumar S. Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. Int J Cancer 1999; 82:385–95.
33. Quarmby S, Hunter RD, Kumar S. Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells. Anticancer Res 2000; 20:3375–81.
34. Rafat M, Rotenstein LS, Hu JL, Auguste DT. Engineered endothelial cell adhesion via VCAM1 and E-selectin antibody-presenting alginate hydrogels. Acta Biomater 2012; 8:2697–703.
35. Yentrapalli R, Azimzadeh O, Barjaktarovic Z, Sarioglu H, Wojcik A, Harms-Ringdahl M, et al. Quantitative proteomic analysis reveals induction of premature senescence in human umbilical vein endothelial cells exposed to chronic low-dose rate gamma radiation. Proteomics 2013; 13:1096–107.
36. Rombouts C, Aerts A, Beck M, De Vos WH, Van Oostveldt P, Benotmane MA, et al. Differential response to acute low dose radiation in primary and immortalized endothelial cells. Int J Radiat Biol 2013; 89:841–50.
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(–Delta Delta C(T)) method. Methods 2001; 25:402–8.
38. Hallahan D, Kuchibhotla J, Wyble C. Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. Cancer Res 1996; 56:5150–5.
39. Hallahan D, Clark ET, Kuchibhotla J, Gewertz BL, Collins T. E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction. Biochem Biophys Res Commun 1995; 217:784–95.
40. Hallahan DE, Kuchibhotla J, Wyble C. Sialyl Lewis X mimetics attenuate E-selectin-mediated adhesion of leukocytes to irradiated human endothelial cells. Radiat Res 1997; 147:41–7.
41. Girinsky TA, Pallardy M, Comoy E, Benassi T, Roger R, Ganem G, et al. Peripheral blood corticotropin-releasing factor, adrenocorticotropic hormone and cytokine (interleukin beta, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha) levels after high- and low-dose total-body irradiation in humans. Radiat Res 1994; 139:360–3.
42. Fedorocko P, Egyed A, Vacek A. Irradiation induces increased

production of haemopoietic and proinflammatory cytokines in the mouse lung. Int J Radiat Biol 2002; 78:305–13.

43. Podor TJ, Jirik FR, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6. Ann N Y Acad Sci 1989; 557:374–85; Discussion 86–7.

44. Watson C, Whittaker S, Smith N, Vora AJ, Dumonde DC, Brown KA. IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. Clin Exp Immunol 1996; 105:112–9.

45. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beausejour CM, Parrinello S, et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. PloS One 2010; 5(2):e9188.

46. Kim YW, West XZ, Byzova TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. J Mol Med (Berl) 2013; 91:323–8.

47. Maier P, Veldwijk MR, Wenz F. Radioprotective gene therapy. Expert Opin Biol Ther 2011; 11:1135–51.

48. Shimada Y, Ito H, Kaji K, Fukuda M. Tumor necrosis factor reduces lifespan of human endothelial cells in vitro. Mech Ageing Dev 1990; 55:245–54.

49. Donneys A, Weiss DM, Deshpande SS, Ahsan S, Tchanque-Fossuo CN, Sarhaddi D, et al. Localized deferoxamine injection augments vascularity and improves bony union in pathologic fracture healing after radiotherapy. Bone 2013; 52:318–25.

50. Kim KS, Kim JE, Choi KJ, Bae S, Kim DH. Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells. Int J Radiat Biol 2014; 90:71–80.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(2001). "Doses to the embryo and fetus from intakes of radionuclides by the mother. A report of The International Commission on Radiological Protection." Ann ICRP **31**(1-3): 19-515.

Adams, M. J., Lipsitz, S. R., Colan, S. D., Tarbell, N. J., Treves, S. T., Diller, L., Greenbaum, N., Mauch, P. and Lipshultz, S. E. (2004). "Cardiovascular status in long-term survivors of Hodgkin's disease treated with chest radiotherapy." J Clin Oncol **22**(15): 3139-3148.

Aikawa, M. and Libby, P. (2004). "Lipid lowering therapy in atherosclerosis." Semin Vasc Med **4**(4): 357-366.

Albelda, S. M. (1991). "Endothelial and epithelial cell adhesion molecules." Am J Respir Cell Mol Biol **4**(3): 195-203.

Albiero, M., Menegazzo, L. and Fadini, G. P. (2010). "Circulating smooth muscle progenitors and atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med **20**(4): 133-140.

Amento, E. P., Ehsani, N., Palmer, H. and Libby, P. (1991). "Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb **11**(5): 1223-1230.

Ando, H., Tsuruoka, S., Yamamoto, H., Takamura, T., Kaneko, S. and Fujimura, A. (2005). "Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase mRNA expression in C57BL/6 mice fed an atherogenic diet." Atherosclerosis **178**(2): 265-269.

Anjos, R. M., Umisedo, N. K., Facure, A., Yoshimura, E. M., Gomes, P. R. and Okuno, E. (2002). "Goiania: 12 years after the 137Cs radiological accident." Radiat Prot Dosimetry **101**(1-4): 201-204.

Arenas, M., Sabater, S., Hernandez, V., Rovirosa, A., Lara, P. C., Biete, A. and Panes, J. (2012). "Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy. Indications, dose, and radiobiological mechanisms involved." Strahlenther Onkol **188**(11): 975-981.

Aslanian, A. M., Chapman, H. A. and Charo, I. F. (2005). "Transient role for CD1d-restricted natural killer T cells in the formation of atherosclerotic lesions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(3): 628-632.

Authors on behalf of ICRP, S. F., Akleyev AV, Hauer-Jensen M, Hendry JH, Kleiman NJ, Macvittie TJ, Aleman BM, Edgar AB, Mabuchi K, Muirhead CR, Shore RE, Wallace WH (2012). "ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs--threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context." Ann ICRP(41(1-2)): 1-322.

Azizova, T. V., Muirhead, C. R., Druzhinina, M. B., Grigoryeva, E. S., Vlasenko, E. V., Sumina, M. V., O'Hagan, J. A., Zhang, W., Haylock, R. G. and Hunter, N. (2010). "Cardiovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948-1958." Radiat Res **174**(2): 155-168.

Azizova, T. V., Muirhead, C. R., Druzhinina, M. B., Grigoryeva, E. S., Vlasenko, E. V., Sumina, M. V., O'Hagan, J. A., Zhang, W., Haylock, R. G. and Hunter, N. (2010). "Cerebrovascular diseases in the cohort of workers first employed at Mayak PA in 1948-1958." Radiat Res **174**(6): 851-864.

Bandazhevskaya, G. S., Nesterenko, V. B., Babenko, V. I., Yerkovich, T. V. and Bandazhevsky, Y. I. (2004). "Relationship between caesium (137Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in 'Chernobyl' children -- preliminary observations after intake of oral apple pectin." Swiss Med Wkly **134**(49-50): 725-729.

Bandazhevsky, Y. I. (2003). "Chronic Cs-137 incorporation in children's organs." Swiss Med Wkly **133**(35-36): 488-490.

Barillari, G., Albonici, L., Incerpi, S., Bogetto, L., Pistritto, G., Volpi, A., Ensoli, B. and Manzari, V. (2001). "Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cells locomotion and growth by enhancing alpha5beta1 integrin expression and function." Atherosclerosis **154**(2): 377-385.

Bertho, J. M. (2012). "Absorbed radiation doses due to chronic ingestion of cesium-137 or Strontium-90 by mice. ." Radioprotection **47**: 219-230.

Bertho, J. M., Faure, M. C., Louiba, S., Tourlonias, E., Stefani, J., Siffert, B., Paquet, F. and Dublineau, I. (2011). "Influence on the mouse immune system of chronic ingestion of 137Cs." J Radiol Prot **31**(1): 25-39.

Bertho, J. M., Louiba, S., Faure, M. C., Tourlonias, E., Stefani, J., Siffert, B., Paquet, F. and Dublineau, I. (2010). "Biodistribution of (137)Cs in a mouse model of chronic contamination by ingestion and effects on the hematopoietic system." Radiat Environ Biophys **49**(2): 239-248.

Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S. and Gimbrone, M. A., Jr. (1987). "Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9238-9242.

Bilato, C. and Crow, M. T. (1996). "Atherosclerosis and the vascular biology of aging." Aging (Milano) **8**(4): 221-234.

Binder, B. R., Christ, G., Gruber, F., Grubic, N., Hufnagl, P., Krebs, M., Mihaly, J. and Prager, G. W. (2002). "Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles." News Physiol Sci **17**: 56-61.

Bobryshev, Y. V. (2006). "Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis." Micron **37**(3): 208-222.

Boffa, M. C., Karochkine, M. and Berard, M. (1991). "Plasma thrombomodulin as a marker of endothelium damage." Nouv Rev Fr Hematol **33**(6): 529-530.

Borghini, A., Gianicolo, E. A., Picano, E. and Andreassi, M. G. (2013). "Ionizing radiation and atherosclerosis: current knowledge and future challenges." Atherosclerosis **230**(1): 40-47.

Brandao-Mello, C. E., Oliveira, A. R., Valverde, N. J., Farina, R. and Cordeiro, J. M. (1991). "Clinical and hematological aspects of 137Cs: the Goiania radiation accident." Health Phys **60**(1): 31-39.

Burleigh, M. C., Briggs, A. D., Lendon, C. L., Davies, M. J., Born, G. V. and Richardson, P. D. (1992). "Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations." Atherosclerosis **96**(1): 71-81.

Calabrese, E. J., Stanek, E. J., 3rd and Nascarella, M. A. (2011). "Evidence for hormesis in mutagenicity dose-response relationships." Mutat Res **726**(2): 91-97.

Calleja, L., Paris, M. A., Paul, A., Vilella, E., Joven, J., Jimenez, A., Beltran, G., Uceda, M., Maeda, N. and Osada, J. (1999). "Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(10): 2368-2375.

Caro, C. G. (2009). "Discovery of the role of wall shear in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(2): 158-161.

Carr, Z. A., Land, C. E., Kleinerman, R. A., Weinstock, R. W., Stovall, M., Griem, M. L. and Mabuchi, K. (2005). "Coronary heart disease after radiotherapy for peptic ulcer disease." Int J Radiat Oncol Biol Phys **61**(3): 842-850.

Carrell, T. W., Burnand, K. G., Wells, G. M., Clements, J. M. and Smith, A. (2002). "Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are overexpressed in the wall of abdominal aortic aneurysms." Circulation **105**(4): 477-482.

Cecchi, X., Wolff, D., Alvarez, O. and Latorre, R. (1987). "Mechanisms of Cs+ blockade in a Ca2+-activated K+ channel from smooth muscle." Biophys J **52**(5): 707-716.

Chaialo, P. P., Chobot'ko, G. M., Shimelis, I. V. and Prevarskii, B. P. (1991). "[Content of blood lipids and characteristics of dyslipoproteinemias in people exposed to radiation during the accident at the Chernobyl nuclear power station]." Ukr Biokhim Zh **63**(6): 93-96.

Constans, J. and Conri, C. (2006). "Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease." Clin Chim Acta **368**(1-2): 33-47.

Coppe, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Krtolica, A., Beausejour, C. M., Parrinello, S., Hodgson, J. G., Chin, K., Desprez, P. Y. and Campisi, J. (2010). "A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen." PLoS One **5**(2): e9188.

Cottin, Y., Kollum, M., Kolodgie, F. D., Chan, R. C., Kim, H. S., Vodovotz, Y., Virmani, R., Waksman, R. and Yazdi, H. (2001). "Intravascular radiation accelerates atherosclerotic lesion formation of hypercholesteremic rabbits." Cardiovasc Radiat Med **2**(4): 231-240.

Cozlea, D. L., Farcas, D. M., Nagy, A., Keresztesi, A. A., Tifrea, R., Cozlea, L. and Carasca, E. (2013). "The impact of C reactive protein on global cardiovascular risk on patients with coronary artery disease." Curr Health Sci J **39**(4): 225-231.

Cwikel, J. G., Goldsmith, J. R., Kordysh, E., Quastel, M. and Abdelgani, A. (1997). "Blood pressure among immigrants to Israel from areas affected by the Chernobyl disaster." Public Health Rev **25**(3-4): 317-335.

Dam, K., Seidler, F. J. and Slotkin, T. A. (1998). "Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration." Brain Res Dev Brain Res **108**(1-2): 39-45.

Dansky, H. M., Barlow, C. B., Lominska, C., Sikes, J. L., Kao, C., Weinsaft, J., Cybulsky, M. I. and Smith, J. D. (2001). "Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(10): 1662-1667.

Darby, S., McGale, P., Correa, C., Taylor, C., Arriagada, R., Clarke, M., Cutter, D., Davies, C., Ewertz, M., Godwin, J., Gray, R., Pierce, L., Whelan, T., Wang, Y. and Peto, R. (2011). "Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials." Lancet **378**(9804): 1707-1716.

Darby, S., McGale, P., Peto, R., Granath, F., Hall, P. and Ekbom, A. (2003). "Mortality from cardiovascular disease more than 10 years after radiotherapy for breast cancer: nationwide cohort study of 90 000 Swedish women." BMJ **326**(7383): 256-257.

Daugherty, A. and Whitman, S. C. (2003). "Quantification of atherosclerosis in mice." Methods Mol Biol **209**: 293-309.

de Groot, E., van Leuven, S. I., Duivenvoorden, R., Meuwese, M. C., Akdim, F., Bots, M. L. and Kastelein, J. J. (2008). "Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **5**(5): 280-288.

de Ruig, W. G. and van der Struijs, T. D. (1992). "Radioactive contamination of food sampled in the areas of the USSR affected by the Chernobyl disaster." Analyst **117**(3): 545-548.

Demerath, E., Towne, B., Blangero, J. and Siervogel, R. M. (2001). "The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women." Ann Hum Biol **28**(6): 664-678.

DeVita, R., Olivieri, A., Spinelli, A., Grollino, M. G., Padovani, L., Tarroni, G., Cozza, R., Sorcini, M., Pennelli, P., Casparrini, G., Crescenzi, G. S., Mauro, F. and Carta, S. (2000). "Health status and internal radiocontamination assessment in children exposed to the fallout of the Chernobyl accident." Arch Environ Health **55**(3): 181-186.

Donneys, A., Weiss, D. M., Deshpande, S. S., Ahsan, S., Tchanque-Fossuo, C. N., Sarhaddi, D., Levi, B., Goldstein, S. A. and Buchman, S. R. (2013). "Localized deferoxamine injection augments vascularity and improves bony union in pathologic fracture healing after radiotherapy." Bone **52**(1): 318-325.

Dublineau, I., Grison, S., Grandcolas, L., Baudelin, C., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J. and Gourmelon, P. (2007). "Effects of chronic 137Cs ingestion on barrier properties of jejunal epithelium in rats." J Toxicol Environ Health A **70**(10): 810-819.

Dusting, G. J., Selemidis, S. and Jiang, F. (2005). "Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall." Mem Inst Oswaldo Cruz **100 Suppl 1**: 97-103.

Fabbri, S., Piva, G., Sogni, R., Fusconi, G., Lusardi, E. and Borasi, G. (1994). "Transfer kinetics and coefficients of 90Sr, 134Cs, and 137Cs from forage contaminated by Chernobyl fallout to milk of cows." Health Phys **66**(4): 375-379.

Falk, E., Schwartz, S. M., Galis, Z. S. and Rosenfeld, M. E. (2007). "Neointimal cracks (plaque rupture?) and thrombosis in wrapped arteries without flow." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(1): 248-249; author reply 250-242.

Fauquette, W., Amourette, C., Dehouck, M. P. and Diserbo, M. (2012). "Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study." Brain Res **1433**: 114-126.

Fedorocko, P., Egyed, A. and Vacek, A. (2002). "Irradiation induces increased production of haemopoietic and proinflammatory cytokines in the mouse lung." Int J Radiat Biol **78**(4): 305-313.

Foulon, O., Lalouette, F., Lambert, F., Martin, S., Fatome, M. and Martin, C. (1999). "Effect of neutron-gamma radiation on dopamine and serotonin metabolism in the rat brain: a regional analysis." J Neurosci Res **55**(6): 770-775.

Gabrys, D., Greco, O., Patel, G., Prise, K. M., Tozer, G. M. and Kanthou, C. (2007). "Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability." Int J Radiat Oncol Biol Phys **69**(5): 1553-1562.

Galis, Z. S. and Khatri, J. J. (2002). "Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly." Circ Res **90**(3): 251-262.

Galis, Z. S., Muszynski, M., Sukhova, G. K., Simon-Morrissey, E., Unemori, E. N., Lark, M. W., Amento, E. and Libby, P. (1994). "Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion." Circ Res **75**(1): 181-189.

Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W. and Libby, P. (1994). "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques." J Clin Invest **94**(6): 2493-2503.

Gaugler, M. H., Squiban, C., Mouthon, M. A., Gourmelon, P. and van der Meeren, A. (2001). "Irradiation enhances the support of haemopoietic cell transmigration, proliferation and differentiation by endothelial cells." Br J Haematol **113**(4): 940-950.

Gaugler, M. H., Squiban, C., van der Meeren, A., Bertho, J. M., Vandamme, M. and Mouthon, M. A. (1997). "Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro." Int J Radiat Biol **72**(2): 201-209.

Getz, G. S. and Reardon, C. A. (2012). "Animal models of atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(5): 1104-1115.

Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R. P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W. P. and Stewart, D. J. (1993). "Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension." N Engl J Med **328**(24): 1732-1739.

Girinsky, T. A., Pallardy, M., Comoy, E., Benassi, T., Roger, R., Ganem, G., Cosset, J. M., Socie, G. and Magdelenat, H. (1994). "Peripheral blood corticotropin-releasing factor, adrenocorticotropic hormone and cytokine (interleukin beta, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha) levels after high- and low-dose total-body irradiation in humans." Radiat Res **139**(3): 360-363.

Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C. K., Stankunavicius, R. and Kolettis, G. J. (1987). "Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries." N Engl J Med **316**(22): 1371-1375.

Gorenne, I., Kavurma, M., Scott, S. and Bennett, M. (2006). "Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis." Cardiovasc Res **72**(1): 9-17.

Griendling, K. K., Sorescu, D., Lassegue, B. and Ushio-Fukai, M. (2000). "Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(10): 2175-2183.

Griendling, K. K., Sorescu, D. and Ushio-Fukai, M. (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.

Grignard, E., Gueguen, Y., Grison, S., Dublineau, I., Gourmelon, P. and Souidi, M. (2010). "Testicular steroidogenesis is not altered by 137 cesium Chernobyl fallout, following in utero or post-natal chronic exposure." C R Biol **333**(5): 416-423.

Grignard, E., Gueguen, Y., Grison, S., Lobaccaro, J. M., Gourmelon, P. and Souidi, M. (2008). "In vivo effects of chronic contamination with 137 cesium on testicular and adrenal steroidogenesis." Arch Toxicol **82**(9): 583-589.

Gross, J. and Lapiere, C. M. (1962). "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." Proc Natl Acad Sci U S A **48**: 1014-1022.

Gueguen, Y., Lestaevel, P., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Jourdain, J. R., Gourmelon, P. and Souidi, M. (2008). "Chronic contamination of rats with 137 cesium radionuclide: impact on the cardiovascular system." Cardiovasc Toxicol **8**(1): 33-40.

Guzik, T. J., Sadowski, J., Guzik, B., Jopek, A., Kapelak, B., Przybylowski, P., Wierzbicki, K., Korbut, R., Harrison, D. G. and Channon, K. M. (2006). "Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(2): 333-339.

Hahne, M., Lenter, M., Jager, U. and Vestweber, D. (1994). "A novel soluble form of mouse VCAM-1 is generated from a glycolipid-anchored splicing variant." Eur J Immunol **24**(2): 421-428.

Hallahan, D., Clark, E. T., Kuchibhotla, J., Gewertz, B. L. and Collins, T. (1995). "E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction." Biochem Biophys Res Commun **217**(3): 784-795.

Hallahan, D., Kuchibhotla, J. and Wyble, C. (1996). "Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium." Cancer Res **56**(22): 5150-5155.

Hallahan, D. E., Kuchibhotla, J. and Wyble, C. (1997). "Sialyl Lewis X mimetics attenuate E-selectin-mediated adhesion of leukocytes to irradiated human endothelial cells." Radiat Res **147**(1): 41-47.

Handl, J., Beltz, D., Botsch, W., Harb, S., Jakob, D., Michel, R. and Romantschuk, L. D. (2003). "Evaluation of radioactive exposure from 137Cs in contaminated areas of Northern Ukraine." Health Phys **84**(4): 502-517.

Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-1695.

Harrison, D., Griendling, K. K., Landmesser, U., Hornig, B. and Drexler, H. (2003). "Role of oxidative stress in atherosclerosis." Am J Cardiol **91**(3A): 7A-11A.

Heckmann, M., Douwes, K., Peter, R. and Degitz, K. (1998). "Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation." Exp Cell Res **238**(1): 148-154.

Heeneman, S., Sluimer, J. C. and Daemen, M. J. (2007). "Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling." Circ Res **101**(5): 441-454.

Henrichs, H., Paretzke, H. G., Voigt, G. and Berg, D. (1989). "Measurements of Cs absorption and retention in man." Health Phys **57**(4): 571-578.

Herrera, M. D., Mingorance, C., Rodriguez-Rodriguez, R. and Alvarez de Sotomayor, M. (2010). "Endothelial dysfunction and aging: an update." Ageing Res Rev **9**(2): 142-152.

Higuchi, S., Ohtsu, H., Suzuki, H., Shirai, H., Frank, G. D. and Eguchi, S. (2007). "Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology." Clin Sci (Lond) **112**(8): 417-428.

Hildebrandt, G., Radlingmayr, A., Rosenthal, S., Rothe, R., Jahns, J., Hindemith, M., Rodel, F. and Kamprad, F. (2003). "Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats." Int J Radiat Biol **79**(12): 993-1001.

Hildebrandt, G., Seed, M. P., Freemantle, C. N., Alam, C. A., Colville-Nash, P. R. and Trott, K. R. (1998). "Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy." Int J Radiat Biol **74**(3): 367-378.

Holler, V., Buard, V., Gaugler, M. H., Guipaud, O., Baudelin, C., Sache, A., Perez Mdel, R., Squiban, C., Tamarat, R., Milliat, F. and Benderitter, M. (2009). "Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin." J Invest Dermatol **129**(5): 1280-1291.

Hooning, M. J., Botma, A., Aleman, B. M., Baaijens, M. H., Bartelink, H., Klijn, J. G., Taylor, C. W. and van Leeuwen, F. E. (2007). "Long-term risk of cardiovascular disease in 10-year survivors of breast cancer." J Natl Cancer Inst **99**(5): 365-375.

Horvath, B., Hegedus, D., Szapary, L., Marton, Z., Alexy, T., Koltai, K., Czopf, L., Wittmann, I., Juricskay, I., Toth, K. and Kesmarky, G. (2004). "Measurement of von Willebrand factor as the marker of endothelial dysfunction in vascular diseases." Exp Clin Cardiol **9**(1): 31-34.

Hoshi, M., Konstantinov, Y. O., Evdeeva, T. Y., Kovalev, A. I., Aksenov, A. S., Koulikova, N. V., Sato, H., Takatsui, T., Takada, J., Endo, S., Shibata, Y. and Yamashita, S. (2000). "Radiocesium in children residing in the western districts of the Bryansk Oblast from 1991-1996." Health Phys **79**(2): 182-186.

Houpert, P., Lestaevel, P., Amourette, C., Dhieux, B., Bussy, C. and Paquet, F. (2004). "Effect of U and 137Cs chronic contamination on dopamine and serotonin metabolism in the central nervous system of the rat." Can J Physiol Pharmacol **82**(2): 161-166.

Hoving, S., Heeneman, S., Gijbels, M. J., te Poele, J. A., Russell, N. S., Daemen, M. J. and Stewart, F. A. (2008). "Single-dose and fractionated irradiation promote initiation and progression of atherosclerosis and induce an inflammatory plaque phenotype in ApoE(-/-) mice." Int J Radiat Oncol Biol Phys **71**(3): 848-857.

IAEA (2006). "Environmental consequences of Chernobyl accident and their remediation: Twenty years of experience." Report of the Chernobyl Forum Expert Group "Environment" (Vienna: IAEA).

ICRP (1994). "Dose coefficients for intakes of radionuclides by workers " report of a task group of committee 2 of the international commission on radionuclides by workers and task group of committee 2 of the international commission on radiological protection **ICRP24**: 1-83.

ICRP (2008). "The concept and use of reference animals and plants." Publication 108 Environmental protection **Ann ICRP38**(Pergamon press (oxford)): 1-242

Igarashi, K. and Miura, M. (2008). "Inhibition of a radiation-induced senescence-like phenotype: a possible mechanism for potentially lethal damage repair in vascular endothelial cells." Radiat Res **170**(4): 534-539.

International Atomic Energy Agency. Department of Research and Isotopes. (1998). Building a better future : contributions of nuclear science and technology. Vienna, International Atomic Energy Agency.

Jin, H. Y., Song, B., Oudit, G. Y., Davidge, S. T., Yu, H. M., Jiang, Y. Y., Gao, P. J., Zhu, D. L., Ning, G., Kassiri, Z., Penninger, J. M. and Zhong, J. C. (2012). "ACE2 deficiency enhances angiotensin II-mediated aortic profilin-1 expression, inflammation and peroxynitrite production." PLoS One **7**(6): e38502.

Johansson, L., A. Björeland, and G. Agren (1998). "Tranfer of 137Cs to infants via human breast milk." Radiat Prot Dosimetry

Joven, J., Rull, A., Ferre, N., Escola-Gil, J. C., Marsillach, J., Coll, B., Alonso-Villaverde, C., Aragones, G., Claria, J. and Camps, J. (2007). "The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain." Atherosclerosis **195**(2): e85-92.

Kapitonova, M. Y., Muid, S., Froemming, G. R., Yusoff, W. N., Othman, S., Ali, A. M. and Nawawi, H. M. (2012). "Real space flight travel is associated with ultrastructural changes, cytoskeletal disruption and premature senescence of HUVEC." Malays J Pathol **34**(2): 103-113.

Kataoka, T. (2013). "Study of antioxidative effects and anti-inflammatory effects in mice due to low-dose X-irradiation or radon inhalation." J Radiat Res **54**(4): 587-596.

Kawanabe, Y. and Nauli, S. M. (2011). "Endothelin." Cell Mol Life Sci **68**(2): 195-203.

Kern, P. M., Keilholz, L., Forster, C., Hallmann, R., Herrmann, M. and Seegenschmiedt, M. H. (2000). "Low-dose radiotherapy selectively reduces adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro." Radiother Oncol **54**(3): 273-282.

Kharchenko, V. P., Rassokhin, B. M. and Zubovskii, G. A. (2001). "[Value of bone densitometry in the determination of vertebral mineral density in participants of the clean-up after Chernobyl accident]." Med Tr Prom Ekol(2): 29-32.

Kharchenko, V. P., Rozhkova, N. I., Zubovskii, G. A., Sergeev, I. E., Smirnov Iu, N., Rozhinskaia, L., Rassokhin, B. M. and Purtova, G. S. (1994). "[Indicators of bone mineral density in persons who had participated in cleaning-up operations after the Chernobyl AES accident]." Vestn Rentgenol Radiol(2): 38-40.

Kim, K. S., Kim, J. E., Choi, K. J., Bae, S. and Kim, D. H. (2014). "Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells." Int J Radiat Biol **90**(1): 71-80.

Kim, Y. W., West, X. Z. and Byzova, T. V. (2013). "Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease." J Mol Med (Berl) **91**(3): 323-328.

Kojima, S., Ishida, H., Takahashi, M. and Yamaoka, K. (2002). "Elevation of glutathione induced by low-dose gamma rays and its involvement in increased natural killer activity." Radiat Res **157**(3): 275-280.

Kovaleva, L. I., Liubchenko, P. N. and Basakova, T. V. (1992). "[The central hemodynamics of participants in the cleanup of the sequelae of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station 4 years after the accident]." Gig Tr Prof Zabol(3): 15-17.

Kundu, J. K. and Surh, Y. J. (2008). "Inflammation: gearing the journey to cancer." Mutat Res **659**(1-2): 15-30.

Langley, R. E., Bump, E. A., Quartuccio, S. G., Medeiros, D. and Braunhut, S. J. (1997). "Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells." Br J Cancer **75**(5): 666-672.

Leggett, R. W., Williams, L. R., Melo, D. R. and Lipsztein, J. L. (2003). "A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body." Sci Total Environ **317**(1-3): 235-255.

Lestaevel, P., Dhieux, B., Tourlonias, E., Houpert, P., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J. and Gourmelon, P. (2006). "Evaluation of the effect of chronic exposure to 137Cesium on sleep-wake cycle in rats." Toxicology **226**(2-3): 118-125.

Lestaevel, P., Racine, R., Bensoussan, H., Rouas, C., Gueguen, Y., Dublineau, I., Bertho, J.-M., Gourmelon, P., Jourdain, J.-R. and Souidi, M. (2010). "Césium 137 : propriétés et effets biologiques après contamination interne." Médecine Nucléaire **Volume 34**(Issue 2): Pages 108–118.

Li, H., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A., Jr. and Libby, P. (1993). "Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma." Am J Pathol **143**(6): 1551-1559.

Libby, P. (2000). "Changing concepts of atherogenesis." J Intern Med **247**(3): 349-358.

Libby, P. (2002). "Atherosclerosis: the new view." Sci Am **286**(5): 46-55.

Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.

Little, M. P., Tawn, E. J., Tzoulaki, I., Wakeford, R., Hildebrandt, G., Paris, F., Tapio, S. and Elliott, P. (2008). "A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms." Radiat Res **169**(1): 99-109.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lyng, F. M., Seymour, C. B. and Mothersill, C. (2001). "Oxidative stress in cells exposed to low levels of ionizing radiation." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 350-353.

Maier, P., Veldwijk, M. R. and Wenz, F. (2011). "Radioprotective gene therapy." Expert Opin Biol Ther **11**(9): 1135-1151.

Malyszko, J., Malyszko, J. S. and Mysliwiec, M. (2010). "Visfatin and endothelial function in dialyzed patients." Nephrology (Carlton) **15**(2): 190-196.

McGale, P. and Darby, S. C. (2005). "Low doses of ionizing radiation and circulatory diseases: a systematic review of the published epidemiological evidence." Radiat Res **163**(3): 247-257.

Meir, K. S. and Leitersdorf, E. (2004). "Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(6): 1006-1014.

Mel'nichenko, E. M., Kushner, A. N., Zafranskaia, M. M. and Miliutin, A. A. (1999). "[The immunoglobulin content in the saliva of children living under different radioecological conditions]." Stomatologiia (Mosk) **78**(2): 12-14.

Menendez, J. C., Casanova, D., Amado, J. A., Salas, E., Garcia-Unzueta, M. T., Fernandez, F., de la Lastra, L. P. and Berrazueta, J. R. (1998). "Effects of radiation on endothelial function." Int J Radiat Oncol Biol Phys **41**(4): 905-913.

Merat, S., Fruebis, J., Sutphin, M., Silvestre, M. and Reaven, P. D. (2000). "Effect of aging on aortic expression of the vascular cell adhesion molecule-1 and atherosclerosis in murine models of atherosclerosis." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **55**(2): B85-94.

Milliat, F., Francois, A., Tamarat, R. and Benderitter, M. (2008). "[Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]." Ann Cardiol Angeiol (Paris) **57**(3): 139-148.

Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H. and Komuro, I. (2002). "Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction." Circulation **105**(13): 1541-1544.

Mitchel, R. E., Hasu, M., Bugden, M., Wyatt, H., Little, M. P., Gola, A., Hildebrandt, G., Priest, N. D. and Whitman, S. C. (2011). "Low-dose radiation exposure and atherosclerosis in ApoE(-)/(-) mice." Radiat Res **175**(5): 665-676.

Mücke, R., Schönekaes, K., Micke, O., Seegenschmiedt, M.H., Berning, D., Heyder, R. (2003). "Low-dose radiotherapy for painful heel spur. Retrospective study of 117 patients." Strahlenther Onkol **179**(11): 774-778.

Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L. and Ross, R. (1994). "ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree." Arterioscler Thromb **14**(1): 133-140.

Nesterenko, V. B., Nesterenko, A. V., Babenko, V. I., Yerkovich, T. V. and Babenko, I. V. (2004). "Reducing the 137Cs-load in the organism of "Chernobyl" children with apple-pectin." Swiss Med Wkly **134**(1-2): 24-27.

Newby, A. C. (2005). "Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture." Physiol Rev **85**(1): 1-31.

Newby, A. C. (2006). "Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates." Cardiovasc Res **69**(3): 614-624.

Nikula, K. J., Muggenburg, B. A., Chang, I. Y., Griffith, W. C., Hahn, F. F. and Boecker, B. B. (1995). "Biological effects of 137CsCl injected in beagle dogs." Radiat Res **142**(3): 347-361.

Nikula, K. J., Muggenburg, B. A., Griffith, W. C., Carlton, W. W., Fritz, T. E. and Boecker, B. B. (1996). "Biological effects of 137CsCl injected in beagle dogs of different ages." Radiat Res **146**(5): 536-547.

Noonan, D. M., De Lerma Barbaro, A., Vannini, N., Mortara, L. and Albini, A. (2008). "Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions." Cancer Metastasis Rev **27**(1): 31-40.

Pacurari, M., Kafoury, R., Tchounwou, P. B. and Ndebele, K. (2014). "The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling." Int J Inflam **2014**: 689360.

Paigen, B. (1995). "Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse." Am J Clin Nutr **62**(2): 458S-462S.

Pakala, R., Leborgne, L., Cheneau, E., Chan, R. C., Yazdi, H., Fournadjiev, J., Weber, D., Hellinga, D., Kolodgie, F., Virmani, R. and Waksman, R. (2003). "Radiation-induced

atherosclerotic plaque progression in a hypercholesterolemic rabbit: a prospective vulnerable plaque model?" Cardiovasc Radiat Med **4**(3): 146-151.

Panes, J., Perry, M. A., Anderson, D. C., Manning, A., Leone, B., Cepinskas, G., Rosenbloom, C. L., Miyasaka, M., Kvietys, P. R. and Granger, D. N. (1995). "Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo." Am J Physiol **269**(6 Pt 2): H1955-1964.

Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodieci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C. and Kolesnick, R. (2001). "Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice." Science **293**(5528): 293-297.

Park, M. T., Oh, E. T., Song, M. J., Lee, H. and Park, H. J. (2012). "Radio-sensitivities and angiogenic signaling pathways of irradiated normal endothelial cells derived from diverse human organs." J Radiat Res **53**(4): 570-580.

Patel, V. B., Bodiga, S., Basu, R., Das, S. K., Wang, W., Wang, Z., Lo, J., Grant, M. B., Zhong, J., Kassiri, Z. and Oudit, G. Y. (2012). "Loss of angiotensin-converting enzyme-2 exacerbates diabetic cardiovascular complications and leads to systolic and vascular dysfunction: a critical role of the angiotensin II/AT1 receptor axis." Circ Res **110**(10): 1322-1335.

Patel, V. B., Zhong, J. C., Fan, D., Basu, R., Morton, J. S., Parajuli, N., McMurtry, M. S., Davidge, S. T., Kassiri, Z. and Oudit, G. Y. (2014). "Angiotensin-converting enzyme 2 is a critical determinant of angiotensin II-induced loss of vascular smooth muscle cells and adverse vascular remodeling." Hypertension **64**(1): 157-164.

Podor, T. J., Jirik, F. R., Loskutoff, D. J., Carson, D. A. and Lotz, M. (1989). "Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6." Ann N Y Acad Sci **557**: 374-385; discussion 386-377.

Preston, D. L., Shimizu, Y., Pierce, D. A., Suyama, A. and Mabuchi, K. (2003). "Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997." Radiat Res **160**(4): 381-407.

Puhakainen, M., Heikkinen, T. and Rahola, T. (2003). "Levels of 90Sr and 137Cs in the urine of Finnish people." Radiat Prot Dosimetry **103**(3): 255-262.

Quarmby, S., Hunter, R. D. and Kumar, S. (2000). "Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells." Anticancer Res **20**(5B): 3375-3381.

Quarmby, S., Kumar, P. and Kumar, S. (1999). "Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions." Int J Cancer **82**(3): 385-395.

Raaf, C. L., Falk, R., Thornberg, C., Zakaria, M. and Mattsson, S. (2004). "Human metabolism of radiocaesium revisited." Radiat Prot Dosimetry **112**(3): 395-404.

Rabelink, T. J., de Boer, H. C. and van Zonneveld, A. J. (2010). "Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease." Nat Rev Nephrol **6**(7): 404-414.

Racine, R., Grandcolas, L., Blanchardon, E., Gourmelon, P., Veyssiere, G. and Souidi, M. (2010). "Hepatic cholesterol metabolism following a chronic ingestion of cesium-137 starting at fetal stage in rats." J Radiat Res **51**(1): 37-45.

Racine, R., Grandcolas, L., Grison, S., Gourmelon, P., Gueguen, Y., Veyssiere, G. and Souidi, M. (2009). "Molecular modifications of cholesterol metabolism in the liver and the brain after chronic contamination with cesium 137." Food Chem Toxicol **47**(7): 1642-1647.

Rafat, M., Rotenstein, L. S., Hu, J. L. and Auguste, D. T. (2012). "Engineered endothelial cell adhesion via VCAM1 and E-selectin antibody-presenting alginate hydrogels." Acta Biomater **8**(7): 2697-2703.

Randolph, G. J. (2013). "Proliferating macrophages prevail in atherosclerosis." Nat Med **19**(9): 1094-1095.

Redman, H. C., McClellan, R. O., Jones, R. K., Boecker, B. B., Chiffelle, T. L., Pickrell, J. A. and Rypka, E. W. (1972). "Toxicity of 137 CsCl in the beagle, Early biological effects." Radiat Res **50**(3): 629-648.

Riley, P. A. (1994). "Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation." Int J Radiat Biol **65**(1): 27-33.

Robbins, C. S., Hilgendorf, I., Weber, G. F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J. L., Gorbatov, R., Sukhova, G. K., Gerhardt, L. M., Smyth, D., Zavitz, C. C., Shikatani, E. A., Parsons, M., van Rooijen, N., Lin, H. Y., Husain, M., Libby, P., Nahrendorf, M., Weissleder, R. and Swirski, F. K. (2013). "Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis." Nat Med **19**(9): 1166-1172.

Rodel, F., Schaller, U., Schultze-Mosgau, S., Beuscher, H. U., Keilholz, L., Herrmann, M., Voll, R., Sauer, R. and Hildebrandt, G. (2004). "The induction of TGF-beta(1) and NF-kappaB parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation." Strahlenther Onkol **180**(4): 194-200.

Rodel, F., Hofmann, D., Auer, J., Keilholz, L., Röllinghoff, M., Sauer, R., Beuscher, H.U. (2008). "The anti-inflammatory effect of low-dose radiation therapy involves a diminished CCL20 chemokine expression and granulocyte/endothelial cell adhesion." Strahlenther Onkol. **184**(1):41-7.

Romanenko, A., Morell-Quadreny, L., Nepomnyaschy, V., Vozianov, A. and Llombart-Bosch, A. (2000). "Pathology and proliferative activity of renal-cell carcinomas (RCCS) and renal oncocytomas in patients with different radiation exposure after the Chernobyl accident in Ukraine." Int J Cancer **87**(6): 880-883.

Rombouts, C., Aerts, A., Beck, M., De Vos, W. H., Van Oostveldt, P., Benotmane, M. A. and Baatout, S. (2013). "Differential response to acute low dose radiation in primary and immortalized endothelial cells." Int J Radiat Biol.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.

Rozhinskaia, L., Marova, E. I., Rassokhin, B. M., Purtova, G. S., Bukhman, A. I., Oganov, V. S., Rakhmanov, A. S., Bakulin, A. V., Rodionova, S. S. and Mishchenko, B. P. (1994). "[Osteopenic syndrome in liquidators of the aftereffects of the accident at the Chernobyl power plant]." Probl Endokrinol (Mosk) **40**(4): 24-27.

Sato, I., Matsusaka, N., Tsuda, S., Kobayashi, H. and Nishimura, Y. (1997). "Relationship between turnover of cesium-137 and dietary potassium content in potassium-restricted mice." Radiat Res **148**(1): 98-100.

Schaue, D., Marples, B. and Trott, K. R. (2002). "The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages." Int J Radiat Biol **78**(7): 567-576.

Schiffrin, E. L. (2012). "Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment." Hypertension **59**(2): 367-374.

Schiller, N. K., Black, A. S., Bradshaw, G. P., Bonnet, D. J. and Curtiss, L. K. (2004). "Participation of macrophages in atherosclerotic lesion morphology in LDLr-/- mice." J Lipid Res **45**(8): 1398-1409.

Schimmenti, L. A., Yan, H. C., Madri, J. A. and Albelda, S. M. (1992). "Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, modulates cell migration." J Cell Physiol **153**(2): 417-428.

Schultz-Hector, S. and Trott, K. R. (2007). "Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data?" Int J Radiat Oncol Biol Phys **67**(1): 10-18.

Schwedhelm, E. and Boger, R. H. (2011). "The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease." Nat Rev Nephrol **7**(5): 275-285.

Secomb, T. W., Dewhirst, M. W. and Pries, A. R. (2012). "Structural adaptation of normal and tumour vascular networks." Basic Clin Pharmacol Toxicol **110**(1): 63-69.

Shao, M., Lu, X., Cong, W., Xing, X., Tan, Y., Li, Y., Li, X., Jin, L., Wang, X., Dong, J., Jin, S., Zhang, C. and Cai, L. (2014). "Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress." PLoS One **9**(3): e92574.

Shimada, Y., Ito, H., Kaji, K. and Fukuda, M. (1990). "Tumor necrosis factor reduces lifespan of human endothelial cells in vitro." Mech Ageing Dev **55**(3): 245-254.

Shimizu, Y., Kodama, K., Nishi, N., Kasagi, F., Suyama, A., Soda, M., Grant, E. J., Sugiyama, H., Sakata, R., Moriwaki, H., Hayashi, M., Konda, M. and Shore, R. E. (2010). "Radiation

exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003." BMJ **340**: b5349.

Skuterud, L., Pedersen, O., Staaland, H., Roed, K. H., Salbu, B., Liken, A. and Hove, K. (2004). "Absorption, retention and tissue distribution of radiocaesium in reindeer: effects of diet and radiocaesium source." Radiat Environ Biophys **43**(4): 293-301.

Sorescu, D., Szocs, K. and Griendling, K. K. (2001). "NAD(P)H oxidases and their relevance to atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med **11**(3-4): 124-131.

Soucy, K. G., Lim, H. K., Benjo, A., Santhanam, L., Ryoo, S., Shoukas, A. A., Vazquez, M. E. and Berkowitz, D. E. (2007). "Single exposure gamma-irradiation amplifies xanthine oxidase activity and induces endothelial dysfunction in rat aorta." Radiat Environ Biophys **46**(2): 179-186.

Souidi, M., Tissandie, E., Grandcolas, L., Grison, S., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P. and Gueguen, Y. (2006). "Chronic contamination with 137cesium in rat: effect on liver cholesterol metabolism." Int J Toxicol **25**(6): 493-497.

Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. and Wissler, R. W. (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **89**(5): 2462-2478.

Stewart, F. A., Heeneman, S., Te Poele, J., Kruse, J., Russell, N. S., Gijbels, M. and Daemen, M. (2006). "Ionizing radiation accelerates the development of atherosclerotic lesions in ApoE-/- mice and predisposes to an inflammatory plaque phenotype prone to hemorrhage." Am J Pathol **168**(2): 649-658.

Stewart, F. A., Hoving, S. and Russell, N. S. (2010). "Vascular damage as an underlying mechanism of cardiac and cerebral toxicity in irradiated cancer patients." Radiat Res **174**(6): 865-869.

Stocker, R. and Keaney, J. F., Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." Physiol Rev **84**(4): 1381-1478.

Stojadinovic, S. and Jovanovic, M. (1966). "Activity of transaminases in the rat serum after internal contamination with 137Cs and 90Sr." Strahlentherapie **131**(4): 633-636.

Stylianou, I. M., Bauer, R. C., Reilly, M. P. and Rader, D. J. (2012). "Genetic basis of atherosclerosis: insights from mice and humans." Circ Res **110**(2): 337-355.

Sundberg, J. and Oskarsson, A. (1991). "Transfer of 137cesium via rat milk: reduction with ammonium ferric hexacyanoferrate." Pharmacol Toxicol **69**(4): 286-290.

Takatsuji, T., Sato, H., Takada, J., Endo, S., Hoshi, M., Sharifov, V. F., Veselkina, II, Pilenko, I. V., Kalimullin, W. A., Masyakin, V. B., Kovalev, A. I., Yoshikawa, I. and Okajima, S.

(2000). "Relationship between the 137Cs whole-body counting results and soil and food contamination in farms near Chernobyl." Health Phys **78**(1): 86-89.

Tanaka, T., Tago, F., Fang, S. P., Shimura, N. and Kojima, S. (2005). "Repeated 0.5-Gy gamma-ray irradiation attenuates autoimmune manifestations in MRL-lpr/lpr mice." Int J Radiat Biol **81**(10): 731-740.

Thomas, R. G. and Thomas, R. L. (1970). "Lethality of 137Cs and 90Sr administered in combination to rats." Radiat Res **42**(2): 282-291.

Thompson, R. C., Allam, A. H., Lombardi, G. P., Wann, L. S., Sutherland, M. L., Sutherland, J. D., Soliman, M. A., Frohlich, B., Mininberg, D. T., Monge, J. M., Vallodolid, C. M., Cox, S. L., Abd el-Maksoud, G., Badr, I., Miyamoto, M. I., el-Halim Nur el-Din, A., Narula, J., Finch, C. E. and Thomas, G. S. (2013). "Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations." Lancet **381**(9873): 1211-1222.

Thornberg, C. and Mattsson, S. (2000). "Increased 137Cs metabolism during pregnancy." Health Phys **78**(5): 502-506.

Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Paquet, F. and Souidi, M. (2006). "Chronic contamination with 137Cesium affects Vitamin D3 metabolism in rats." Toxicology **225**(1): 75-80.

Titov, L. P., Kharitonic, G. D., Gourmanchuk, I. E. and Ignatenko, S. I. (1995). "Effects of radiation on the production of immunoglobulins in children subsequent to the Chernobyl disaster." Allergy Proc **16**(4): 185-193.

Tourlonias, E., Bertho, J. M., Gurriaran, R., Voisin, P. and Paquet, F. (2010). "Distribution of 137Cs in rat tissues after various schedules of chronic ingestion." Health Phys **99**(1): 39-48.

Travnikova, I. G., Bruk, G. J., Shutov, V. N., Bazjukin, A. B., Balonov, M. I., Rahola, T. and Tillander, M. (2001). "Contribution of different foodstuffs to the internal exposure of rural inhabitants in Russia after the Chernobyl accident." Radiat Prot Dosimetry **93**(4): 331-339.

Trott, K. R., Parker, R. and Seed, M. P. (1995). "[The effect of x-rays on experimental arthritis in the rat]." Strahlenther Onkol **171**(9): 534-538.

Tsukimoto, M., Homma, T., Mutou, Y. and Kojima, S. (2009). "0.5 Gy gamma radiation suppresses production of TNF-alpha through up-regulation of MKP-1 in mouse macrophage RAW264.7 cells." Radiat Res **171**(2): 219-224.

Tsukimoto, M., Nakatsukasa, H., Sugawara, K., Yamashita, K. and Kojima, S. (2008). "Repeated 0.5-Gy gamma irradiation attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis with up-regulation of regulatory T cells and suppression of IL17 production." Radiat Res **170**(4): 429-436.

Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Kapralova, V. I., Wasserloos, K., Mosher, M., Epperly, M. W., Greenberger, J. S., Pitt, B. R. and Kagan, V. E. (2011). "Oxidative lipidomics of gamma-radiation-induced lung injury: mass spectrometric characterization of cardiolipin and phosphatidylserine peroxidation." Radiat Res **175**(5): 610-621.

Ungvari, Z., Podlutsky, A., Sosnowska, D., Tucsek, Z., Toth, P., Deak, F., Gautam, T., Csiszar, A. and Sonntag, W. E. (2013). "Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebromicrovascular endothelial cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular radiosensitivity." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **68**(12): 1443-1457.

United Nations. Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. (2000). Sources and effects of ionizing radiation : United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation : UNSCEAR 2000 report to the General Assembly, with scientific annexes. New York, United Nations.

United States. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. and Syracuse Research Corporation. (2004). Toxicological profile for cesium. Atlanta, Ga., Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Varnum, S. M., Springer, D. L., Chaffee, M. E., Lien, K. A., Webb-Robertson, B. J., Waters, K. M. and Sacksteder, C. A. (2012). "The effects of low-dose irradiation on inflammatory response proteins in a 3D reconstituted human skin tissue model." Radiat Res **178**(6): 591-599.

Virmani, R., Burke, A. P., Farb, A. and Kolodgie, F. D. (2006). "Pathology of the vulnerable plaque." J Am Coll Cardiol **47**(8 Suppl): C13-18.

Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D. and Farb, A. (2002). "Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions." J Interv Cardiol **15**(6): 439-446.

Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A. and Schwartz, S. M. (2000). "Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1262-1275.

Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Finn, A. V., Gold, H. K., Tulenko, T. N., Wrenn, S. P. and Narula, J. (2005). "Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(10): 2054-2061.

Visse, R. and Nagase, H. (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-839.

von Pannewitz, G. (1970). "[Radiotherapy of arthrosis deformans. Method and results]." Radiologe **10**(2): 51-54.

von Zallinger, C. and Tempel, K. (1998). "Transplacental transfer of radionuclides. A review." Zentralbl Veterinarmed A **45**(10): 581-590.

Vykhovanets, E. V., Chernyshov, V. P., Slukvin, II, Antipkin, Y. G., Vasyuk, A. and Colos, V. (2000). "Analysis of blood lymphocyte subsets in children living around Chernobyl exposed long-term to low doses of cesium-137 and various doses of iodine-131." Radiat Res **153**(6): 760-772.

Wagenseil, J. E. and Mecham, R. P. (2009). "Vascular extracellular matrix and arterial mechanics." Physiol Rev **89**(3): 957-989.

Walldius, G. and Jungner, I. (2005). "Rationale for using apolipoprotein B and apolipoprotein A-I as indicators of cardiac risk and as targets for lipid-lowering therapy." Eur Heart J **26**(3): 210-212.

Wasserman, R. H. and Comar, C. L. (1961). "The influence of dietary potassium on the retention of chronically ingested cesium-137 in the rat." Radiat Res **15**: 70-77.

Watson, C., Whittaker, S., Smith, N., Vora, A. J., Dumonde, D. C. and Brown, K. A. (1996). "IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes." Clin Exp Immunol **105**(1): 112-119.

Weissberg, P. L., Clesham, G. J. and Bennett, M. R. (1996). "Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial?" Lancet **347**(8997): 305-307.

Whitman, S. C., Ravisankar, P., Elam, H. and Daugherty, A. (2000). "Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice." Am J Pathol **157**(6): 1819-1824.

Wong, F. L., Yamada, M., Sasaki, H., Kodama, K. and Hosoda, Y. (1999). "Effects of radiation on the longitudinal trends of total serum cholesterol levels in the atomic bomb survivors." Radiat Res **151**(6): 736-746.

Worgul, B. V., Kundiyev, Y. I., Sergiyenko, N. M., Chumak, V. V., Vitte, P. M., Medvedovsky, C., Bakhanova, E. V., Junk, A. K., Kyrychenko, O. Y., Musijachenko, N. V., Shylo, S. A., Vitte, O. P., Xu, S., Xue, X. and Shore, R. E. (2007). "Cataracts among Chernobyl clean-up workers: implications regarding permissible eye exposures." Radiat Res **167**(2): 233-243.

Wu, T. C. (2007). "The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion." Cancer Res **67**(13): 6003-6006.

Xiangdong, L., Yuanwu, L., Hua, Z., Liming, R., Qiuyan, L. and Ning, L. (2011). "Animal models for the atherosclerosis research: a review." Protein Cell **2**(3): 189-201.

Yamada, Y., Shiomi, H., Sumida, I., Suzuki, O., Isohashi, F., Oh, R. J., Tanaka, E., Inoue, T. and Nakamura, H. (2004). "Quantitative evaluation of changes in irradiated lung fields after stereotactic irradiation by the Polygon Method." Radiat Med **22**(2): 98-105.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T. (1988). "A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca2+ channels." J Hypertens Suppl **6**(4): S188-191.

Yasunari, T. J., Stohl, A., Hayano, R. S., Burkhart, J. F., Eckhardt, S. and Yasunari, T. (2011). "Cesium-137 deposition and contamination of Japanese soils due to the Fukushima nuclear accident." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(49): 19530-19534.

Yentrapalli, R., Azimzadeh, O., Barjaktarovic, Z., Sarioglu, H., Wojcik, A., Harms-Ringdahl, M., Atkinson, M. J., Haghdoost, S. and Tapio, S. (2013). "Quantitative proteomic analysis reveals induction of premature senescence in human umbilical vein endothelial cells exposed to chronic low-dose rate gamma radiation." Proteomics **13**(7): 1096-1107.

Yentrapalli, R., Azimzadeh, O., Sriharshan, A., Malinowsky, K., Merl, J., Wojcik, A., Harms-Ringdahl, M., Atkinson, M. J., Becker, K. F., Haghdoost, S. and Tapio, S. (2013). "The PI3K/Akt/mTOR pathway is implicated in the premature senescence of primary human endothelial cells exposed to chronic radiation." PLoS One **8**(8): e70024.

Yilmaz, M. I., Sonmez, A., Ortiz, A., Saglam, M., Kilic, S., Eyileten, T., Caglar, K., Oguz, Y., Vural, A., Cakar, M., Egido, J., Altun, B., Yenicesu, M., Blanco-Colio, L. M. and Carrero, J. J. (2011). "Soluble TWEAK and PTX3 in nondialysis CKD patients: impact on endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes." Clin J Am Soc Nephrol **6**(4): 785-792.

Yoshida, N. T., Y. (2012). "Fukushima Daiichi: Land-Surface Contamination by Radionuclides from the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident " ELEMENTS **v. 8 no. 3**: p. 201-206

Yoshimura, E. M., Umisedo, N. K., Facure, A., Anjos, R. M. and Okuno, E. (2001). "Ambient dose equivalent rate in Goiania 12 years after the 137Cs radiological accident." Health Phys **80**(6): 532-536.

Young, E. F. and Smilenov, L. B. (2011). "Impedance-based surveillance of transient permeability changes in coronary endothelial monolayers after exposure to ionizing radiation." Radiat Res **176**(4): 415-424.

Yu, T., Parks, B. W., Yu, S., Srivastava, R., Gupta, K., Wu, X., Khaled, S., Chang, P. Y., Kabarowski, J. H. and Kucik, D. F. (2011). "Iron-ion radiation accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Radiat Res **175**(6): 766-773.

Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J. and Lisheng, L. (2004). "Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study." Lancet **364**(9438): 937-952.

Zhavoronkova, L. A., Gogitidze, N. V. and Kholodova, N. B. (1996). "[The characteristics of the late reaction of the human brain to radiation exposure: the EEG and neuropsychological study (the sequelae of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station)]." Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova **46**(4): 699-711.

◆ Suite aux accidents nucléaires de Tchernobyl (1986) ou Fukushima (2011), de grandes quantités de radioéléments ont été disséminées dans l'environnement. Parmi ces derniers, le césium 137 est le radionucléide le plus abondant et constitue la principale source d'exposition des populations avoisinantes sur le long terme, notamment par son intégration dans la chaîne alimentaire. Ce sont quelques milliers de becquerels qui sont quotidiennement ainsi ingérés. Un important questionnement concerne donc les effets potentiels que peuvent induire une telle exposition sur les fonctions physiologiques. Concernant le système cardiovasculaire, il existe une corrélation entre la dose d'exposition et la fréquence d'apparition de pathologies cardiovasculaires. Cependant, lorsqu'il s'agit d'une exposition à faibles doses, comme en cas de situations post-accidentelles, les études ne sont pas toutes en accord, dû au caractère multifactoriel de ces maladies, une grande prudence est nécessaire quant à l'interprétation des données épidémiologiques.

Ainsi, ce travail de thèse vise à compléter les études épidémiologiques disponibles suivant une exposition interne à faibles doses de césium 137, et plus particulièrement dans le cadre de la pathologie athéromateuse. En effet, l'athérosclérose est reconnue comme étant la 1ère cause de mortalité/morbidité dans les pays industrialisés.

Des animaux prédisposés à la pathologie (souris ApoE$^{-/-}$), ont été exposés à des concentrations de césium de 4 à 100 kBq.L^{-1} pendant 3, 6 ou 9 mois. Ainsi, au bout de 3 mois d'exposition, les animaux ayant reçu la plus forte concentration présentent une augmentation de certains paramètres inflammatoires, notamment IFN-γ et VCAM-1, ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur média-intima comparé aux animaux témoins. De plus, nous avons noté des variations concomitantes de l'expression d'enzymes pro/anti oxydantes (p47, p67, GPx). Ces observations ne perdurent pas au fil du temps. En effet, après 6 et 9 mois d'exposition, les plaques d'athérome qui se sont formées présentent des caractéristiques de stabilité plus importantes que les animaux témoins, avec des paramètres pro-inflammatoires (CRP, TNF-α, MCP-1 et IFN-γ) diminués, une augmentation du contenu en collagène, ainsi qu'une baisse de l'expression de certaines collagénases.

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une exposition interne chronique à faibles doses de césium 137 ne potentialise pas la pathologie athéromateuse dans notre modèle expérimental. Une telle exposition induit la mise en place d'une réponse adaptative au cours du temps, allant en faveur d'une amélioration du phénotype des plaques d'athérome, en agissant sur la balance des cytokines pro/anti inflammatoires, ainsi qu'une modulation du système anti-oxydant.

Mots clés : athérosclérose, césium 137, exposition chronique, faibles doses, inflammation, stress oxydant

◆ Large amounts of radionuclides were released in the environment after the Chernobyl (1986) or Fukushima-Daichii (2011) nuclear accidents, and mostly cesium 137. Populations living in contaminated territories are chronically exposed to radionuclides by ingestion of contaminated food. There is a real interrogation about the potential effects that could be induced following such ionizing exposure on physiological functions in the long term. Concerning the cardiovascular system, there is a correlation between the irradiation dose and the appearance of cardiovascular diseases. However, when we focused on post-accidental situations, with a low dose exposure, available data are not all in accordance, due to multifactorial aspect of these pathologies. Epidemiological results should be interpreted carefully.

Thus, the aim of my thesis is to complete epidemiological studies about chronic internal γ low dose exposure, using cesium 137, in an atheromatous context. Atherosclerosis and its consequences are known to be the main cause of mortality/morbidity in industrialized countries.

Predisposed animals (ApoE$^{-/-}$ mice) were exposed to ^{137}Cs through the drinking water. The concentration range was 4 to 100 kBq.L^{-1}, to surround concentration found in contaminated territories around Chernobyl. Exposure times were 3, 6 or 9 months to follow atherosclerosis progression. After 3 months exposure, for the early stages, mice exposed to the highest dose presented an increase in some inflammatory cytokines, notably IFN-γ and VCAM-1, with an intimal-medial thickness increased compared to non-exposed animals. Moreover, at this time exposure, we noticed concomitant variation of genic expression of pro and anti-oxydative enzymes (p47, p67, GPx). These effects are only transient and do not perdure over the time. Indeed, after 6 and 9 months exposure, atheromatous plaque observed in the aortic sinus, present more stability parameters than the control group (collagen), with also a decrease in pro-inflammatory profile cytokines expression (CRP, TNF-α, MCP-1 et IFN-γ), and MMPs expression, and increase in GPx activity compared to the control group.

All together, these results suggest that chronic internal exposure to low dose ionizing radition with ^{137}Cs do not potentiate atherosclerosis progression. Such exposure induces an adaptive response along the experimental process, with an amelioration of atheromatous plaque phenotype, acting on the balance of pro/anti-inflammatory cytokines, pro/anti oxydant system.

Keywords: atherosclerosis, cesium 137, chronic exposure, low doses, inflammation, oxidative stress