



HAL
open science

Effets des faibles doses de rayonnements ionisants γ dans la pathologie athéromateuse : étude des mécanismes de modulation de l'inflammation.

Nicolas Rey

► **To cite this version:**

Nicolas Rey. Effets des faibles doses de rayonnements ionisants γ dans la pathologie athéromateuse : étude des mécanismes de modulation de l'inflammation.. Toxicologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASQ002 . tel-03287750

HAL Id: tel-03287750

<https://theses.hal.science/tel-03287750v1>

Submitted on 15 Jul 2021

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.

Effets des faibles doses de rayonnements ionisants γ dans la pathologie athéromateuse : étude des mécanismes de modulation de l'inflammation.

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

Ecole doctorale n° 569, Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Toxicologie

Unité de recherche : Laboratoire de radiotoxicologie et radiobiologie expérimentale, IRSN

Référent : Faculté de pharmacie

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses le
05/02/2021, par
Nicolas REY

Composition du Jury

François COUDORÉ

PR, Faculté de pharmacie, Université Paris saclay

Président

Sarah BAATOUT

PR, Belgian Nuclear Research Centre

Rapporteur & Examinatrice

Stéphane POTTEAUX

DR, Inserm U976, Univ. De Paris

Rapporteur & Examinatrice

Karl BALABANIAN

DR, Inserm U1160, Univ. de Paris

Examineur

Serge CANDÉIAS

CR, CEA, Grenoble, France

Examineur

Stéphanie LEHOUX

PR, Lady Davis Institute of Medical Research, Montreal Canada

Directrice de thèse

Teni EBRAHIMIAN

CR, IRSN, Fontenay aux Roses, France

Co-encadrante

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery

Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

Remerciements

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier le Docteur Stéphane Potteaux et le Professeur Sarah Baatout pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteur.

Je remercie le Docteur Serge Candéias pour avoir accepté d'être membre de mon jury en tant qu'examinateur.

Je remercie également le Docteur Karl Balabanian pour ses conseils, et pour m'avoir fait l'honneur de participer en tant qu'examinateur à l'évaluation de ma thèse.

Je tiens à remercier le Professeur François Coudoré pour son accompagnement durant ces années d'études de pharmacie et d'avoir accepté d'être mon président de jury.

Je souhaite aussi tout particulièrement remercier le Docteur Stéphanie Lehoux pour ses qualités d'encadrement et pour ses nombreux conseils qui m'ont guidé durant ce travail de thèse.

Je remercie le Docteur Dmitry Klovov, chef de laboratoire du LRTOX, qui par son esprit scientifique et sa bienveillance, a pu insuffler une ambiance formidable au sein de notre équipe.

Je dois maintenant remercier le Docteur Teni Ebrahimian. Merci pour tout Teni. Merci de m'avoir permis de passer ces 4 années d'aventures à tes côtés. Tous ces échanges que nous avons eus sur le plan professionnel et humain ont été si enrichissants que je ne n'aurais pas pu espérer mieux pour une thèse. Je sais que dans le futur, je garderais en mémoire tous ces bons moments passés ensemble. J'espère que nous nous recroiserons, même pour un dépannage de souris sait-on jamais ?!

Je souhaite également remercier chaleureusement le Docteur Talin Ebrahimian. Merci Talin, pour tout le soutien que tu m'as apporté durant ce travail malgré les milliers de kilomètres qui nous séparaient ! Tu étais ma 3^{ème} encadrante non-officielle, et j'ai énormément appris grâce à toi. Je te souhaite une bonne continuation !

Je tiens à remercier tous les membres du LRTOX, anciens et nouveaux que j'ai eu la chance de côtoyer pendant toutes ces années !

Un grand merci à tous les chercheurs de l'équipe ; aux Docteurs Chrystelle Ibanez, Christelle Durand, Imène Garali, Guillaume Varès, Stéphane Grison pour leur bonne humeur au quotidien et pour tous les conseils qu'ils m'ont prodigué.

Un grand merci à Dimitri Kereselidze, qui m'a énormément aidé lors de ma dernière année de thèse et qui est maintenant parti vers d'autres horizons, je te souhaite le meilleur ! Je remercie également Céline Gloaguen, pour son aide sans failles durant toutes ces années, je te souhaite à toi aussi une bonne continuation ! Enfin je souhaiterais remercier Christelle Elie, toujours présente très tôt le matin au laboratoire avec ta joie de vivre et ta bonne humeur, merci !

Je souhaite évidemment remercier tous ceux de la team Cardiovasc' ! Tout d'abord un grand merci à Saloua Dimassi. J'espère te revoir bientôt afin que l'on repasse des moments sympathiques comme à Manchester, nos désaccords sur tous les sujets vont finir par me manquer ! Merci à Goran Riazi et à Hélène Quelquejay ! Goran tu es maintenant bientôt le seul de l'équipe à porter la moustache c'est une lourde responsabilité, sois en digne. Hélène, prend bien soin de Goran et continuez à accumuler les dossiers et photos sur ce beau mur !

Enfin merci à toi Virginie pour tout ton apport de compétences et tes conseils très précieux qui m'ont bien aidé durant ma fin de thèse !

Merci Léo Macé, mon voisin de bureau, je sais que tu vas faire un très beau travail de thèse, tu tiens le bon bout, je te souhaite une bonne chance pour la suite !

Je tiens également à remercier Chloé Brizais Florence Bachelot, et Vénus Nélo pour leur aide en cette dernière année de thèse.

Enfin je remercie tous ceux que j'ai croisés et appréciés au cours de ces 4 années de thèse.

Je remercie tous mes amis qui m'ont soutenu durant toutes ces années et qui ont été très présents en cette année si particulière de pandémie. Ils m'ont permis de traverser cette épreuve de la meilleure façon.

Je remercie ma famille, toujours présente, qui sait se rendre disponible et qui me soutient depuis toujours.

SOMMAIRE

Remerciements	4
Sommaire	6
Liste des abréviations	8
Liste des figures	9
Liste des tableaux	11
Résumé	13
Contexte	17
Introduction	20
I. Radioactivité	20
1. Définition	20
2. Unités de mesure	22
3. Exposition des populations	23
4. Effets biologiques et sanitaires : introduction à la radiobiologie	25
5. Modèles d'extrapolation des effets en radiobiologie	26
6. Lien avec la pathologie athéromateuse	30
II. Athérosclérose	31
1. Généralités	31
2. Épidémiologie	31
3. Physiopathologie	32
4. Modèles d'étude de l'athérosclérose	41
III. Athérosclérose et le système immunitaire	43
1. Préambule	43
2. Système immunitaire inné	44
3. Système immunitaire adaptatif	68
IV. Impact des rayonnements ionisants sur l'athérosclérose et le système immunitaire	85
1. Effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur le système immunitaire	85
2. Impact des rayonnements ionisants dans la pathologie athéromateuse	91
Problématiques	97
Matériels et méthodes	99
I. Etude des effets à doses faibles et modérées de rayonnements γ sur des modèles murins ApoE^(-/-) prédisposés à l'athérosclérose : immunophénotypage des populations monocytaires sanguines et lymphocytaires spléniques et étude de l'expression génique en molécules d'adhésions et de cytokines aortiques	99
1. Animaux et irradiations	99
2. Prélèvements tissulaires et analyses	100
II. Etude des effets des faibles doses de rayonnements ionisants γ sur des modèles murins ApoE^(-/-) prédisposés à l'athérosclérose sur la polarisation des macrophages à court délai post-irradiation et étude des conséquences phénotypiques et immunologiques sur la plaque d'athérosclérose à long terme	102

1. Animaux et irradiations	102
2. Protocole de polarisation des macrophages issus de moelle osseuse de souris ApoE ^(-/-)	102
3. Immunophénotypage des populations monocytaires sanguines et spléniques	105
4. Immunomarquages et colorations	105
III. Données complémentaires : études de motilité et transmigration de lignées humaines THP-1 et culture clonale de progéniteurs murins	107
1. Etude de transmigration et motilité cellulaire	107
2. Culture clonale de progéniteurs murins	110
Résultats	112
Résultats in vivo	113
I. Résultats (1)	113
II. Résultats (2)	132
III. Résultats complémentaires <i>in vitro</i>	158
1. Etude de transmigration et de motilité monocytaire	158
2. Etude des capacités de prolifération des progéniteurs myéloïdes	159
Discussions et perspectives	162
I. Effet sur les acteurs immunitaires impliqués dans l'athérosclérose	162
1. Monocytes	162
2. Macrophages	164
3. Lymphocytes T	166
II. Effets liés à la dose, au débit de dose et au temps	167
III. Impact du microenvironnement	168
Conclusion générale	172
Valorisations	174
I. Publications	174
II. Communications	175
III. Autre	175
Bibliographie	178

LISTE DES ABBREVIATIONS

- Ac: Anticorps
- APC: Cellule présentatrice d'antigène
- ApoE: Alipoprotéine E
- ATM: Ataxia telangiectasia mutated
- Bq: Becquerel
- CD: Cellule dendritique
- CE: Cellule endothéliale
- C/EBP: CCAAT-box/Enhancer Binding Protein
- CIPR: Commission internationale de protection radiologique
- CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
- CML: Cellule musculaire lisse
- Cs: Césium
- CVD: maladie cardiovasculaire
- FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting
- GAPDH: Glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase
- Gy: Gray
- HDL: High Density Lipoprotein
- HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
- HSP-70: Heat Shock Protein-70
- ICAM-1: Molécule d'Adhésion intercellulaire-1
- Ig: Immunoglobuline
- IL: Interleukine
- INF- γ : Interféron- gamma
- IRSN: Institut de Radioprotection et de la sûreté Nucléaire
- JAK-STAT: Janus kinases signal transducer and activator of transcription proteins
- JNK: c-Jun N-terminal kinase
- LDIR: Low Dose Ionizing Radiation
- LDL: Low Density Lipoproteine
- LPS: Lipopolysaccharide
- Ly T: Lymphocyte T
- MAP: Mitogen-activated protein Kinase
- MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1
- M-CSF: Macrophage Colony Stimulating factor
- MMP: Metallo-Protéinase Matricielle
- NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
- NMRI: Naval Medical Research
- NO: Monoxyde d'azote
- OCT: Optimum cutting temperature
- OMS: Organisation Mondiale de la Santé
- ROS: Espèces Réactives de l'Oxygène
- RT-PCR: « Polymerase Chain Reaction » en temps réel
- Sele: Sélectine
- SEM: Erreur standard de la moyenne
- Sv : Sievert
- TGF β : Transforming Growth factor beta
- TNF α : Tumor Necrosis alpha
- UNSCEAR: Comité scientifique des Nations unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants
- VCAM-1: Molécule d'adhésion Vasculaire-1
- VLDL: Very Low density Lipoprotein

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 Composition d'un atome.</i>	20
<i>Figure 2 Radioactivité α.</i>	21
<i>Figure 3 Radioactivité β.</i>	21
<i>Figure 4 Radioactivité γ.</i>	21
<i>Figure 5 Pouvoir pénétrant des rayonnements ionisants (IRSN 2019) – L'énergie dégagée par les rayons n'est pas identique. Une feuille de papier suffit à arrêter un rayon alpha, tandis qu'il faut 1 mètre de plomb ou de béton pour arrêter un rayonnement γ.</i>	22
<i>Figure 6 Les trois unités de dose des rayonnements ionisants.</i>	23
<i>Figure 7 Exposition externe (CNRS).</i>	23
<i>Figure 8 Exposition interne (CNRS).</i>	24
<i>Figure 9 Exposition de la population française à la radioactivité (IRSN).</i>	25
<i>Figure 10 Courbes doses-réponses possibles décrivant l'excès de risques stochastiques à faible doses d'irradiation (Boice Jr 2017).</i>	27
<i>Figure 11 Relation dose-effet selon le modèle hormétique.</i>	27
<i>Figure 12 Hypothèse d'induction de la réponse adaptative, par la production d'espèces réactives de l'oxygène (Dimova, Bryant, et Chankova 2008).</i>	29
<i>Figure 13 Taux de mortalité par maladie vasculaire chez les 35 à 69 ans, par sexe au Royaume-Uni entre 1950 et 2010 (Herrington William et al. 2016).</i>	31
<i>Figure 14 Séquences de progression de l'athérosclérose (Houston 2013).</i>	35
<i>Figure 15 Dysfonction endothéliale : Hausse de la perméabilité - Migration et adhésion accrue des monocytes.</i>	37
<i>Figure 16 Migration des CML de la média vers l'intima et activation des cellules endothéliales.</i>	38
<i>Figure 17 Phagocytose des lipides par les macrophages.</i>	39
<i>Figure 18 Formation et évolution d'une plaque d'athérosclérose (Rafieian-Kopaei et al. 2014).</i>	40
<i>Figure 19 Processus de phagocytose et de destruction d'un pathogène.</i>	45
<i>Figure 20 Voies d'activation du complément (Chaplin 2010).</i>	47
<i>Figure 21 Interaction entre monocytes et la plaque d'athérome d'après la revue de Hilgendorf (Hilgendorf, Swirski, et Robbins 2015).</i>	52
<i>Figure 22 Sous-populations de macrophages et action dans la plaque d'athérosclérose (Colin, Chinetti-Gbaguidi, et Staels 2014).</i>	58
<i>Figure 23 Mécanismes impliqués dans la formation des cellules spumeuses. L'internalisation accrue des LDL et l'estérification du cholestérol conduisent à une accumulation excessive d'esters de cholestérol sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme (Yu et al. 2013).</i>	62
<i>Figure 24 Activation de la réponse immunitaire innée par la voie de l'inflammasome NLRP3 par des lipoprotéines (Göran K. Hansson et Hermansson 2011).</i>	63
<i>Figure 25 Protéine intracellulaire (d'origine virale par exemple) prise en charge par le CMH-I puis exposée à la surface cellulaire pour présentation aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (Kobayashi et Van Den Elsen 2012).</i>	69

<i>Figure 26 Internalisation d'un antigène extracellulaire suivie d'une prise en charge par le CMH-II et exposition à la surface pour présentation aux lymphocytes T CD4+ (Kobayashi et Van Den Elsen 2012).</i>	70
<i>Figure 27 Structure du complexe TCR.</i>	71
<i>Figure 28 Présentation des différents types de lymphocytes et leurs effets sur la plaque d'athérosclérose.</i>	74
<i>Figure 29 Action du système immunitaire adaptatif par le biais des cellules T dans l'athérosclérose (Tabas et Lichtman 2017).</i>	76
<i>Figure 30 Effets d'une exposition au césium sur la composition des plaques d'athérosclérose en macrophage.</i>	95
<i>Figure 31 Protocole expérimental d'euthanasie des animaux - récupération de sang par ponction intracardiaque, de la rate et de l'aorte abdominale.</i>	101
<i>Figure 32 Modalités d'irradiation de l'animale et durée de mise en repos post-irradiation.</i>	102
<i>Figure 33 Protocole de mise en culture et de polarisation des macrophages issus de moelle osseuse de souris ApoE^(-/-) exposés à des doses faibles et modérées de rayonnements ionisants.</i>	103
<i>Figure 34 Protocole expérimental à long terme post-irradiation - des cyrosections de sinus aortiques ont été utilisées afin de réaliser des analyses d'immunofluorescence pour quantification de macrophages, lymphocytes T et cellules musculaires lisses. Des colorations à l'huile rouge et au rouge Picosirius ont également été effectuées afin de quantifier les lésions lipidiques et le collagène au sein des plaques d'athérome.</i>	106
<i>Figure 35 Membrane poreuse pour test de transmigration des THP-1.</i>	108
<i>Figure 36 Répartition des cellules au sein des plaques Corning selon le temps d'incubation et la dose d'irradiation.</i>	109
<i>Figure 37 Schéma de membrane poreuse accompagné d'un tapis endothélial de cellules Huvec.</i>	109
<i>Figure 38 Exemple d'unités de formations de colonies: CF-M, CFU-G, CFU-GM.</i>	110
<i>Figure 39 Quantification de la motilité et transmigration des THP-1 après exposition à des doses faibles et modérées de rayonnements ionisants en fonction du temps de latence post-irradiation. Des cultures de lignées monocytaires Thp-1 furent exposées en externe à des rayons γ puis déposées dans des inserts poreux (8μm) afin de mimer leur capacité à migrer vers le chimio attractant MCP-1. A : capacité motile des Thp-1 à travers l'insert poreux sans tapis endothélial. B : capacité migratoire des THP-1 à travers l'insert poreux avec tapis endothélial Huvec. Les résultats sont exprimés comme le rapport de cellules en abluminal divisé par le nombre de cellules en luminaire x 100 sous forme de nuages de points. N=4 à 6 flasques par doses et par temps post irradiation. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 par rapport au groupe contrôle non-irradié.</i>	158
<i>Figure 40 Nombres de colonies CFU-G (A), GM (B) et M (C) comptabilisés après exposition aux doses faibles et modérées de rayonnements ionisants et en fonction du temps de latence post-irradiation. Des souris ApoE^(-/-) prédisposées à l'athérosclérose ont été exposées par irradiation externe à des rayons γ (0.05, 0.5 et 1 Gy). Les cellules hématopoïétiques de moelle osseuses des animaux ont été mises en culture afin de faire proliférer des unités de colonies. Le nombre de ces colonies a été comptabilisé 11 jours après la mise en culture. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 par rapport au contrôle non-irradié.</i>	159
<i>Figure 41 Nuage de points ou « Dot plot » représentant les cellules CD115 positives parmi les cellules CD11b+Gr dans la moelle osseuse, la rate et dans la circulation sanguine.</i>	164

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Effet d'une irradiation aiguë selon l'organe exposé (Institut de radioprotection et sûreté nucléaire (IRSN)).	26
Tableau 2 Classification de Sary.	32
Tableau 3 Aperçu des modèles murins d'étude de l'athérosclérose (Veseli et al. 2017).	42
Tableau 4 Sous-types de monocytes circulants murins et leur équivalent dans l'espèce humaine (Shi et Pamer 2011).	51
Tableau 5 Chimioquinas impliquées dans le trafic monocyttaire (Shi et Pamer 2011).	54
Tableau 6 Molécules d'adhésion impliquées dans le trafic monocyttaire (Shi et Pamer 2011).	56
Tableau 7 Résumé des principaux sous-types de macrophages décrits <i>in vitro</i> , les principaux inducteurs de la polarisation et leurs caractéristiques (MAR : Récepteur au Mannose avec du collagène.) (Colin, Chinetti-Gbaguidi, et Staels 2014).	60
Tableau 8 Influence du type de cholestérol dans la polarisation des macrophages.	64
Tableau 9 Action des cytokines dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Fatkhullina, Peshkova, et Koltsova 2016).	83
Tableau 10 Liste non exhaustive des effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur la réponse immunitaire.	90
Tableau 11 Modalités d'irradiation à doses faibles et modérées des souris ApoE ^(-/-) à débits de doses chroniques et aiguës - les temps de latence après irradiation sont également indiqués.	99
Tableau 12 Sous-type lymphocytaires et monocytaires selon leurs marqueurs de surfaces.	100
Tableau 13 Liste des amorces.	101
Tableau 14 Liste des amorces (2).	104

RESUME

Il est bien établi que l'exposition aux fortes doses de rayonnements ionisants favorise le développement de l'athérosclérose, une pathologie inflammatoire chronique qui affecte la paroi des vaisseaux de gros et moyens calibres. Cependant les mécanismes biologiques des faibles doses de rayonnements ionisants sur cette pathologie sont moins bien documentés.

Plusieurs travaux ont néanmoins mis en évidence que dans un contexte d'athérosclérose, l'exposition aux doses faibles pouvait, contrairement aux doses fortes, entraîner une réponse en faveur d'une modulation de l'inflammation et une hausse de la stabilité des plaques d'athérome (Le Gallic et al. 2015a; T. G. Ebrahimian et al. 2017; Mancuso, Pasquali, Braga-Tanaka III, et al. 2015; Mitchel et al. 2011). Ces études suggèrent que la dose et le débit de dose sont déterminants dans la survenue de cette réponse adaptative.

L'objet de cette thèse est donc d'étudier les mécanismes adaptatifs immunomodulateurs mis en jeu dans l'athérosclérose après exposition à des doses faibles et modérées. A cette fin, l'évaluation de l'impact de la dose et du débit de dose dans cette réponse a été étudiée, puis les mécanismes immunitaires précoces et leurs conséquences à long terme sur la pathologie athéromateuse ont été explorés.

Une première approche expérimentale a été réalisée sur un modèle de souris prédisposées à l'athérosclérose ($ApoE^{(-/-)}$) exposées à des doses faibles et modérées d'irradiation γ à débits de doses chroniques et aiguës. Nous avons ainsi pu observer que les populations immunitaires ont une réponse non linéaire en fonction de la dose et dépendante du type cellulaire étudié. Les populations monocytaires pro-inflammatoires étaient diminuées à l'ensemble des doses tandis que des populations lymphocytaires pro-inflammatoires étaient diminuées uniquement à très faibles doses et débits de dose.

Dans un second temps, une autre approche expérimentale sur un modèle $ApoE^{(-/-)}$ fut dédiée à l'étude des mécanismes précoces post-irradiations (24 heures et 10 jours) sur principalement la polarisation des macrophages ainsi que les conséquences tardives sur le phénotype des plaques.

Ainsi, 24 heures après irradiation, nous avons constaté une régulation à la hausse de gènes à action anti-inflammatoire (*Chil-3* et *Retnla*) ainsi qu'une augmentation concomitante de la sécrétion en interleukine-10 chez les macrophages de type M2. Concernant les études à long terme, nous n'avons pas observé de modifications par rapport à la stabilité des plaques d'athérome, néanmoins, la teneur en macrophages intra plaques était significativement abaissée à la plus forte des doses appliquées. Par ailleurs la proportion en monocytes spléniques était significativement augmentée après 100 jours, laissant entrevoir une hausse possible du stockage splénique des monocytes à long terme enclenchée par l'irradiation.

L'ensemble de ces résultats confirme l'occurrence d'un mécanisme adaptatif immunomodulateur à doses faibles et modérées dans le contexte de l'athérosclérose. Cette réponse est néanmoins dépendante du type cellulaire étudié et a des conséquences différentes en fonction de la dose et du débit de dose étudié. De plus, lors de l'application d'une dose modérée, nous avons mis en évidence la

présence d'un mécanisme adaptatif observé plusieurs mois après irradiation au niveau de la plaque d'athérome et au niveau du système immunitaire.

RESUME

It is well established that exposure to high doses of ionizing radiation promotes the development of atherosclerosis, a chronic inflammatory pathology that affects the walls of large and medium-gauge vessels. However, the biological mechanisms of low doses of ionizing radiation on this pathology are less well documented.

Several studies have nevertheless shown that in a context of atherosclerosis, exposure to low doses can, unlike high doses, lead to a response in favor of modulation of inflammation, and an increase in the stability of atheromatous plaques (Le Gallic et al. 2015; Ebrahimian et al. 2017; Mancuso et al. 2015; Mitchel et al. 2011). These studies suggest that dose and dose rate are critical to the occurrence of this adaptive response.

The purpose of this thesis is therefore to study the immunomodulatory adaptive mechanisms involved in atherosclerosis after exposure to low and moderate doses. To this end, the impact of dose and dose rate in this response has been studied, then the early immune mechanisms and their long-term consequences have been explored.

A first experimental approach was performed on a model of atherosclerotic predisposed mice (ApoE^{-/-}) exposed to low and moderate doses of radiation γ at chronic and acute dose rates. We were able to observe that immune populations have a non-linear response to dose and dependent on the cell type studied. Pro-inflammatory monocyte populations were decreased at all doses while pro-inflammatory populations lymphocytes were decreased only at very low doses and dose rates.

In a second step, another experimental approach on ApoE^{-/-} model was dedicated to the study of early post-irradiation mechanisms (24 hours and 10 days) on primary monocytes and macrophages. In addition, the late consequences in pathology by external exposure to ionizing radiation γ at low and moderate doses (100 days) were also explored.

Thus, 24 hours after irradiation, we observed an upregulation of genes with anti-inflammatory action (Chil-3 and Retnla) as well as a concomitant increase in interleukin-10 secretion in M2 macrophages. In the long-term studies, we did not observe any changes with respect to the stability of the atheroma plaques, however, the intra-plate macrophage content was significantly lowered at the highest of the applied doses. In addition, the proportion of splenic monocytes was significantly increased after 100 days, suggesting a possible increase in long-term splenic monocyte storage triggered by irradiation.

All these results confirm the occurrence of an adaptive immunomodulatory mechanism at low and moderate doses in the context of atherosclerosis. This response is nevertheless dependent on the cell type and has different consequences depending on the dose and dose rate applied. Moreover, when a high dose rate is applied at a moderate dose, we have demonstrated the presence of an adaptive mechanism observed several months after irradiation at the level of the atheroma plaque and at the level of the immune system.

CONTEXTE

La radioactivité fut découverte par Henri Becquerel en 1896. C'est une découverte qui sera marquante dans l'histoire scientifique et elle continue d'exercer aujourd'hui une influence très concrète. Bien que ses applications soient controversées et régulièrement portées comme sujet central dans nos débats politiques, les propriétés physiques de la radioactivité ont permis l'élaboration de très nombreuses applications utiles dans nos sociétés.

Dans le domaine médical, la radioactivité a permis l'élaboration de techniques de diagnostic des cancers par le biais des scintigraphies ou tomographies. Celles-ci permettent d'observer directement les organes en fonctionnement dans l'organisme. Mais elles peuvent également traiter directement certaines pathologies cancéreuses par radiothérapie. De plus l'utilisation de « traceurs » radioactifs permettant de suivre à la trace son parcours dans le vivant est un outil formidable en biologie.

La radioactivité est évidemment un maillon essentiel dans notre production d'énergie. En France, terre de naissance d'Henri Becquerel, près des $\frac{3}{4}$ de l'électricité française sont produits par des centrales nucléaires. Ce sont des atomes radioactifs comme l'uranium ou le plutonium qui dégagent une très grande quantité de chaleur par phénomène de fission nucléaire. Cette chaleur fait augmenter la température de l'eau générant de la vapeur qui fait tourner une turbine entraînant un alternateur produisant l'électricité.

Ainsi, toutes ces applications ont mené à une exposition de plus en plus importante de personnes aux rayonnements ionisants issus de la radioactivité. Cela a ainsi ouvert le monde de la radiobiologie, c'est-à-dire l'étude des effets sur les êtres vivants des rayonnements ionisants.

La prise de conscience des effets biologiques des rayonnements ionisants fut rapide, entre 1896 et 1897, 25 publications sur les effets nocifs des rayons X ont été publiées, ces publications portaient le plus souvent sur des brûlures de peau et des nécroses tissulaires observées chez des expérimentateurs manipulant des produits radioactifs et inconscients du risque à l'époque. L'accumulation de nouvelles connaissances à propos des effets biologiques liés à l'exposition aux irradiations a clairement mis en évidence un risque lié à l'exposition aux fortes doses.

Cependant, avec la mise en application de la radioactivité à travers les diverses activités citées plus haut, des populations de plus en plus grandes ont été exposées aux rayonnements ionisants de façon chroniques et à des doses plus faibles. Nous pouvons prendre comme exemple la catastrophe de Tchernobyl, qui a entraîné une libération importante de césium 137 dans l'environnement, et les populations environnantes ayant été en contact pendant plusieurs années avec la radioactivité émise par cet élément radioactif. Les études épidémiologiques ont rapidement mis en évidence une hausse de la survenue de cancers ainsi que de maladies non-cancéreuses.

Parmi ces dernières, les maladies cardiovasculaires vont en particulier attirer notre attention dans ce mémoire. En effet il a été démontré dans de nombreuses études épidémiologiques et expérimentales que les rayonnements ionisants peuvent entraîner des pathologies cardiovasculaires à forte dose, cependant les effets d'une exposition à faible dose sur les conséquences cardiovasculaires font encore l'objet d'incertitudes.

En effet les travaux épidémiologiques parviennent à prédire les effets des rayonnements ionisants à des doses de plus en plus faibles, et il s'avère que pour des doses modérées de rayonnements ionisants comprises entre 0,5 et 5 Gy il y a un risque à long terme de survenue de maladies cardiovasculaires. Ce risque est cependant faible à des doses inférieures à 0,5 Gy et les mécanismes biologiques impliqués à cette dose ne sont pas entièrement compris. L'utilisation d'études expérimentales est donc essentielle afin de comprendre les mécanismes qui surviennent lors de ce type d'exposition. Ainsi des études réalisées sur des modèles animaux prédisposés à l'athérosclérose et exposés à des doses faibles de rayonnements ionisants ont démontré une réponse adaptative qui n'entraînait pas d'effets délétères mais au contraire une réponse anti-inflammatoire dans le contexte de l'athérosclérose. La compréhension des mécanismes mis en jeu induisant cette réponse adaptative, l'existence d'un effet dose ou débit de dose, et le temps de latence post irradiation permettront d'affiner nos connaissances en radiobiologie.

Introduction

INTRODUCTION

I. Radioactivité

1. Définition

La radioactivité est un phénomène omniprésent dans l'univers. Cela provient du fait que l'intégralité des éléments composant la matière (solide, liquide ou gazeux) est constituée d'éléments de taille infime : les atomes. Ceux-ci se composent de 3 types de particules (Figure 1) :

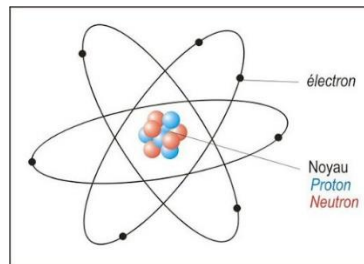


Figure 1 Composition d'un atome.

- Les protons, chargés positivement ;
- Les neutrons, non chargés (les protons et les neutrons composent le noyau) ;
- Les électrons, chargés négativement, qui gravitent autour du noyau.

Les atomes peuvent être stables ou instables. Les noyaux atomiques instables sont à l'origine du rayonnement radioactif. Lorsqu'un noyau contient trop de neutrons et de protons, il prend une forme instable et cherche à retrouver sa stabilité en éjectant des protons et des neutrons excédentaires. Il émet alors des particules énergétiques sous forme de rayons et c'est ce phénomène qui correspond à la radioactivité.

Dans notre quotidien, nous sommes entourés par de nombreux types de rayonnement (couramment appelés rayons), visibles ou invisibles. Mais la plupart de ces rayonnements (radio, téléphonie mobile, micro-ondes) ne sont pas ionisants. Un rayonnement est une émission d'énergie et/ou un faisceau de particules. Certains rayonnements (X et gamma) sont dits ionisants car ils émettent des « rayons » d'énergies suffisantes pour transformer les atomes qu'ils traversent en ions.

Ainsi lorsqu'un atome est de nature instable, ou après un contact avec un rayonnement, il cherchera à se stabiliser en émettant des rayonnements qui sont de différente nature.

Rayonnement alpha: causé par la perte de protons et de neutrons (Figure 2).

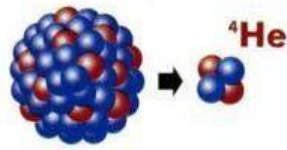


Figure 2 Radioactivité α .

Rayonnement bêta: causé par la transformation d'un neutron en proton ou l'inverse. Il y a alors émission de rayonnement β^- ou β^+ (Figure 3).

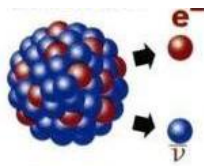


Figure 3 Radioactivité β .

Rayonnement gamma: causé par l'émission d'un photon, engendrant un rayonnement X et γ (Figure 4).

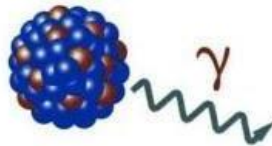


Figure 4 Radioactivité γ .

Les rayonnements provoquent des effets différents sur l'organisme en fonction du type de rayonnement et de la dose reçue. L'énergie dégagée n'est en effet pas identique pour tous les rayonnements, et les moyens de s'en protéger sont donc différents. Par exemple, une feuille de papier est suffisante pour arrêter les rayonnements alpha, mais il faut un mètre de béton ou de plomb pour arrêter des rayonnements gamma (Figure 5) (IRSN 2019).

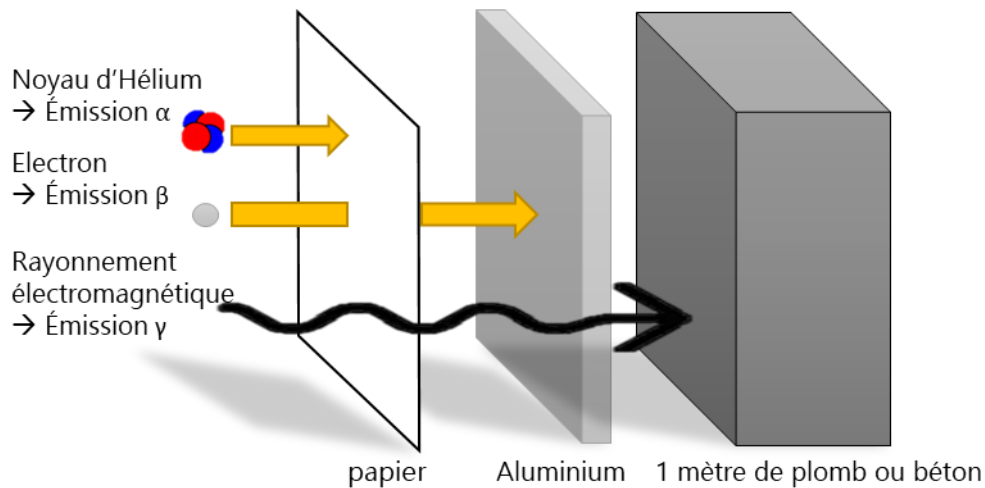


Figure 5 Pouvoir pénétrant des rayonnements ionisants (IRSN 2019) – L'énergie dégagée par les rayons n'est pas identique. Une feuille de papier suffit à arrêter un rayon alpha, tandis qu'il faut 1 mètre de plomb ou de béton pour arrêter un rayonnement γ .

Dans notre quotidien, nous sommes en contact permanent avec la radioactivité. Celle-ci peut être d'origine naturelle, et être issue de la Terre, du cosmos ou de l'alimentation. Mais elle peut être également d'origine artificielle lors d'exams ou de thérapies médicales. Ou, beaucoup plus rarement, provenir des rejets autorisés des installations nucléaires ou conséquence des retombées radioactives à la suite des essais d'armes nucléaires dans l'atmosphère.

2. Unités de mesure

Trois unités sont fréquemment utilisées dans le domaine du nucléaire : le becquerel (Bq), le gray (Gy) et le sievert (Sv) (Figure 6).

Becquerel (Bq)

Mesure l'activité (nombre de désintégrations par seconde) de la matière radioactive. Anciennement, l'unité de mesure utilisée était le curie (Ci). Un curie (1 Ci) équivaut à $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq.

Gray (Gy)

Mesure la dose physiquement « absorbée » par la matière. Elle représente l'énergie absorbée par un kilogramme exposé à un rayonnement ionisant apportant une énergie d'1 joule : $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Joule} \cdot \text{kg}^{-1}$. Anciennement, l'unité de mesure utilisée était le rad ($1 \text{ gray} = 100 \text{ rad}$).

Sievert (Sv)

Elle est l'unité de mesure des doses équivalentes et efficaces, qui permettent d'évaluer l'impact du rayonnement sur la matière vivante. Ainsi peut-on comparer l'effet d'une même dose délivrée par des rayonnements de nature différente à l'organisme entier, des organes ou des tissus qui n'ont pas la même sensibilité aux rayonnements.

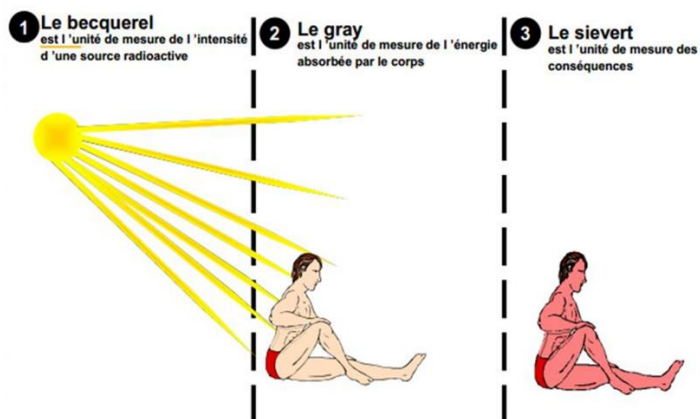


Figure 6 Les trois unités de dose des rayonnements ionisants.

3. Exposition des populations

Il existe deux types d'exposition aux rayonnements ionisants: l'exposition interne et externe.

L'irradiation correspond à une exposition externe aux rayonnements ionisants, c'est-à-dire lorsqu'une personne se trouve exposée de l'extérieur par les rayonnements ionisants émis par une source radioactive située dans son voisinage (Figure 7). Dans ce cas, l'exposition cesse dès lors que la source de radioactivité est éloignée de la personne ou si un écran (blindage par exemple) est interposé entre la personne et la source.

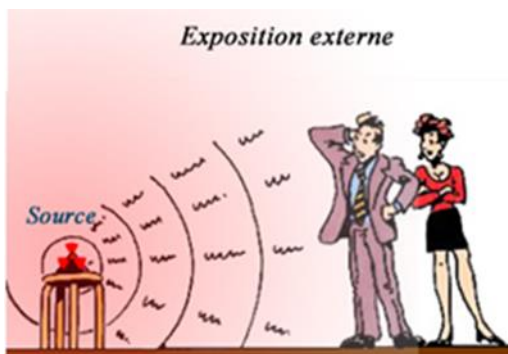


Figure 7 Exposition externe (CNRS).

L'exposition interne correspond à une contamination aux particules radioactives, c'est-à-dire quand des éléments radioactifs ont pénétré à l'intérieur de l'organisme. Ceci peut se produire par inhalation des particules radioactives présentes dans l'air, par ingestion d'aliments contaminés, par des particules radioactives, ou via contact direct avec la peau ou une plaie (on parle dans ce cas de « contamination externe »). Lors d'une contamination, l'exposition aux particules radioactives se poursuit tant que la source est à l'intérieur ou au contact du corps (Figure 8).



Figure 8 Exposition interne (CNRS).

En France métropolitaine l'exposition moyenne par habitant est de 4,5 mSv. Cette exposition est au 2/3 d'origine naturelle correspondant à une dose efficace de 2,9 mSv par année. Elle provient principalement de :

- l'irradiation cosmique par des photons ou particules originaires de l'espace, par l'irradiation tellurique avec des éléments radioactifs qui proviennent de la croûte terrestre.
- la consommation de produits alimentaires ou d'eaux de boissons contenant des éléments radioactifs,
- dans certaines régions françaises, l'inhalation de radon qui est un gaz émanant du sol.
- de sources artificielles dont la majorité provient des examens médicaux à visée de diagnostic (médecine nucléaire, scanner et radiographie) qui représentent $1,6 \text{ mSv.an}^{-1}$.

Les rejets autorisés des centrales nucléaires, les retombées radioactives dues aux anciens essais atmosphériques d'armes nucléaires ou des accidents de Tchernobyl et Fukushima conduisent ensemble à une exposition autour de 0,02 mSv par an (Figure 9). Il faut cependant prendre en compte que cette exposition n'est absolument pas homogène au sein de la population. Les travailleurs du nucléaire, le personnel du transport aérien, ou le personnel radio médical sont plus exposés que la moyenne.

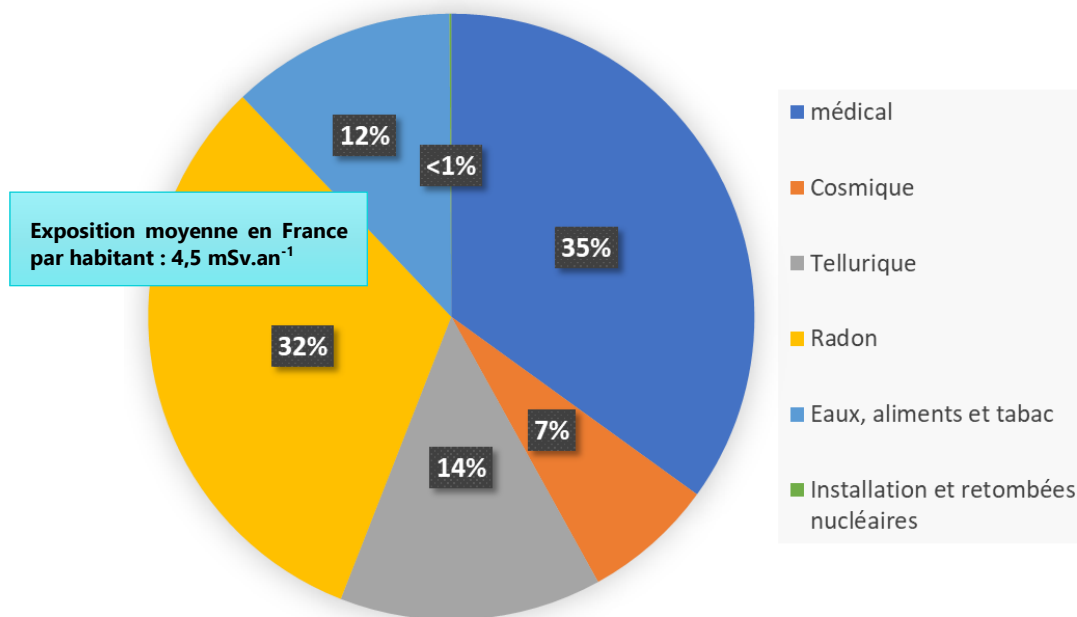


Figure 9 Exposition de la population française à la radioactivité (IRSN).

4. Effets biologiques et sanitaires : introduction à la radiobiologie

Les rayonnements ionisants peuvent affecter les cellules vivantes et ainsi altérer leur matériel génétique et induire des lésions. Les cellules disposent heureusement de mécanismes de réparation. Néanmoins, en cas de défaut de réparation, une cellule peut mourir ou à l’opposé devenir une cellule cancéreuse.

Les effets des rayonnements ionisants sur les organismes vivants vont grandement varier en fonction de la dose reçue mais aussi de tout un ensemble de facteurs tel que :

- La source de rayonnement : activité, intensité de fonctionnement, nature, énergie.
- Le mode d’exposition : temps et débit
- La cible : tissus ou organes touchés, âge de l’individu exposé.

Ainsi, nous distinguons deux types d’effets biologiques :

Déterministes : Ce sont des effets qui se produisent de manière certaine. Pour des doses élevées, ils sont observés chez tous les sujets exposés. Ce sont des effets à seuil dont la gravité augmente avec la dose absorbée. Ces effets déterministes comprennent par exemple la cataracte, l’érythème et les fibroses. Des exemples d’effet en fonction de la dose sont donnés ci-après (Tableau 1).

Tableau 1 Effet d'une irradiation aiguë selon l'organe exposé (Institut de radioprotection et sûreté nucléaire (IRSN)).

Dose (en Gy)	1	5	10	20	50
Atteinte de la peau	ROUGEURS BRULURES NECROSE				
Atteinte des gonades	TEMPO PROLONGEE IRREVERSIBLE				Chez l'homme
	TEMPORAIRE PROLONGEE		Chez la femme		
Atteinte du cristallin	CATARACTE				

Stochastiques : Ce sont des effets aléatoires, sans seuils dont la probabilité d'apparition augmente avec la dose, le délai d'apparition de ces effets est de plusieurs années. Ces effets vont notamment concerner les cancers et les mutations génétiques (Institut de radioprotection et sûreté nucléaire (IRSN)).

5. Modèles d'extrapolation des effets en radiobiologie

A. Modèle « LNT » Linéaire sans seuil

La prise de conscience des risques à long terme liés aux irradiations et la possibilité d'effets génétiques néfastes fut un moteur pour l'émergence d'organisations chargées d'émettre des recommandations concernant l'exposition aux rayonnements ionisants. On peut notamment distinguer la CIPR (Commission internationale de protection radiologique) qui émet des recommandations concernant la mesure de l'exposition aux rayonnements ionisants et les mesures de sécurité à prendre au niveau des installations sensibles. En 1959, La CIPR adopte le modèle LNT « Linéaire sans seuil », ce modèle partait du principe qu'avec les connaissances des effets à fortes doses de rayonnements ionisants, il était possible d'extrapoler les effets à faibles doses selon une courbe linéaire. Ce modèle s'appuyait sur de nombreuses données épidémiologiques et s'est vu renforcé par l'addition de nouvelles données liées aux accidents de Tchernobyl ou de Three Mile Island. Ce modèle LNT est bien établi dans les réglementations impliquant la radioprotection. Mais ce modèle est de plus en plus remis en cause au sein de la communauté scientifique (Council et others 2006; 2006; Strom, Cameron, et Cohen 1998; Tubiana et al. 2009; Mossman 1998; Little et al. 2009). En effet, différents modèles se présentent comme des alternatives au modèle LNT dont le modèle avec seuil, le modèle supra ou sub-linéaire et en particulier le modèle de l'hormèse que nous allons détailler dans la partie suivante. Un aperçu des courbes doses-réponses comprenant ces différents modèles est représenté ci-dessous (Figure 10).

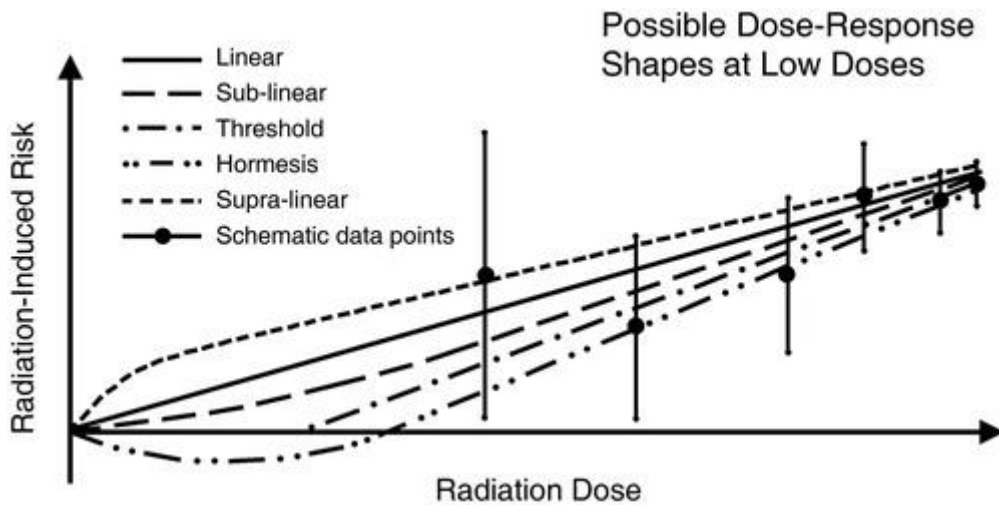


Figure 10 Courbes doses-réponses possibles décrivant l'excès de risques stochastiques à faibles doses d'irradiation (Boice Jr 2017).

B. Hormèse et réponse adaptative

i. Hormèse

L'hormèse est un phénomène de relation dose-réponse biphasique à un agent environnemental qui est caractérisé par une stimulation (effet bénéfique) à faible dose et par une inhibition (effet toxique) à forte dose (Mattson 2008). C'est un phénomène qui a été fréquemment observé dans de nombreuses études et qui semble être indépendant de l'agent chimique ou physique, du modèle biologique et du paramètre mesuré. Etant bi-phasique, elle est caractérisée par une courbe dose-effet en forme de U (Figure 11).

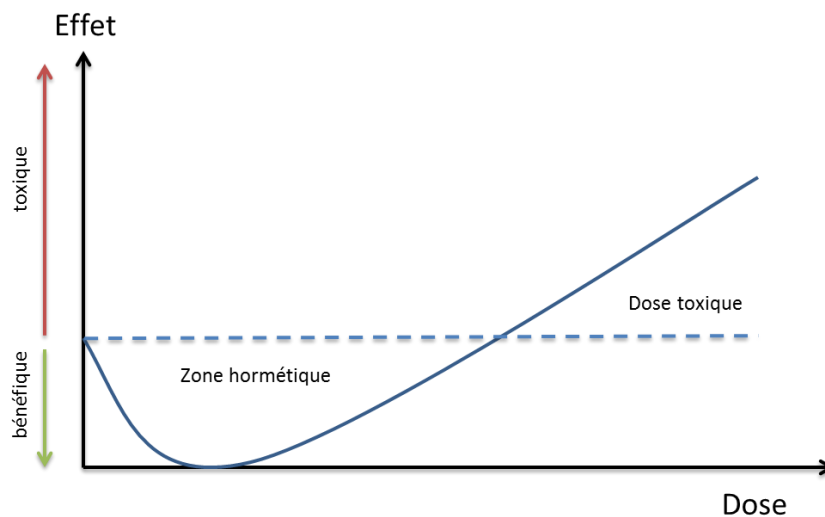


Figure 11 Relation dose-effet selon le modèle hormétique.

L'hormèse est un phénomène intrinsèquement lié à l'exposition aux faibles doses de rayonnements ionisants. Ses effets bénéfiques sont variables, ils peuvent inclure une hausse de la longévité, une hausse

de la croissance ou de la production d'embryons, ou encore une augmentation de la réponse immunitaire pour renforcer les mécanismes de réparation cellulaire qui protège des maladies (Upton 2001).

Il est difficile de prédire les effets radio-induits lors d'une exposition à faible dose. Cette imprévisibilité est due en partie à la distribution énergétique dans les tissus des rayonnements à faibles doses ; les particules se répartissent de manière aléatoire et avec une faible densité dans les tissus. Ils engendrent des réactions d'ionisation et d'excitation le long de leur trajet, ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Mais l'irradiation entraîne également une réponse biologique se traduisant par une génération métabolique importante de ROS et d'autres toxines endogènes (Kim et al. 2012; Pollycove et Feinendegen 2003).

Les mécanismes cellulaires gouvernant l'hormèse sont multiples, cependant plusieurs voies de transduction du signal ont été identifiées comme ayant un rôle majeur dans sa survenue : nous pouvons citer la voie du « Mitogen-activated protein Kinase » ou MAP qui favorise la croissance cellulaire, la voie du « c-Jun N-terminal kinase » ou JNK, une voie de signalisation impliquée dans l'apoptose, le facteur de transcription p53, impliqué dans le cycle cellulaire, l'apoptose ou l'autophagie et enfin la protéine ATM¹ qui a une fonction de réparation des cassures double brin dans l'ADN (Tang et Loke 2015).

ii. Réponse adaptative

La réponse adaptative peut être considérée comme un phénomène non spécifique dans lequel l'exposition à de faibles doses d'un agent stressant peut résulter, ultérieurement, à une résistance à une concentration accrue de ce même stressant.

Les organismes sont exposés à de nombreux agents chimiques ou physiques. Ainsi, de nombreux mécanismes de défense ont évolué afin de minimiser le risque génotoxique, l'un d'eux est la résistance radio-induite que l'on peut aussi appeler la réponse adaptative. En radiobiologie, cette réponse est caractérisée par le fait qu'une dose faible d'irradiation entraîne une radiorésistance accrue dans les heures qui suivent (Hillova et Drážil 1967). Ainsi, la réponse adaptative exprime la capacité des faibles doses de rayonnements ionisants à induire des changements cellulaires qui peuvent contenir les dommages ultérieurs provoqués par l'irradiation (Wolff 1998; M. Joiner et al. 1996; M. C. Joiner, Lambin, et Marples 1999).

Ce phénomène a été observé dans de nombreux organismes : bactéries, algues, cellules d'insecte, de mammifère ou cellules humaines ainsi que dans des modèles *in vivo* ou *in vitro* après exposition à de faibles doses d'irradiation X ou γ (Hosoi et Sakamoto 1993; Ishii et al. 1996; Day et al. 2007). Ces effets ont été observés à travers diverses méthodes, telles que l'évaluation de la survie cellulaire, le repérage de mutations géniques ou de mutations répétées, ou encore les aberrations chromosomiques, la formation de micronoyaux, la modification d'expression de gènes, et les pontages simples ou doubles brins.

L'hypothèse expliquant ce phénomène serait que la réponse adaptative est induite par les ROS. Ces espèces sont produites de façon naturelle dans les organismes par le métabolisme mais sont également

¹ Ataxia telangiectasia mutated

formées après exposition à différents stimuli comme les irradiations. En effet les irradiations ionisantes, peuvent endommager l'ADN par ionisation directe ou indirectement lorsque l'ADN interagit avec des réactifs radio-induits. Les radicaux libres peuvent endommager les protéines, les lipides et générer des intermédiaires pouvant réagir avec l'ADN (Figure 12).

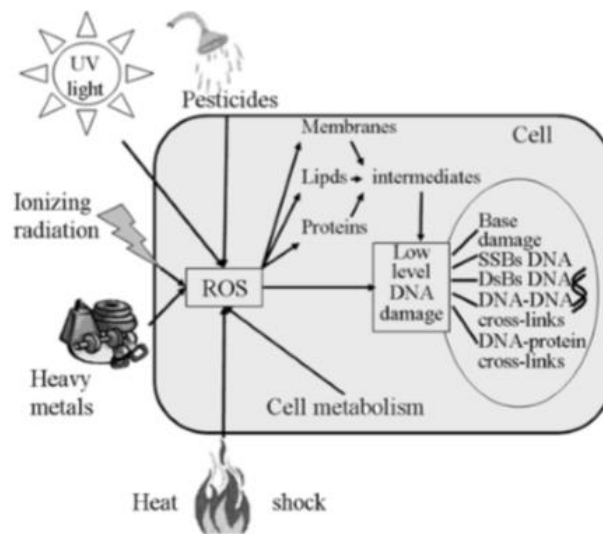


Figure 12 Hypothèse d'induction de la réponse adaptative, par la production d'espèces réactives de l'oxygène (Dimova, Bryant, et Chankova 2008).

Les ROS pourraient également induire de multiples lésions localisées notamment des lésions des bases constituant l'ADN, des cassures simple et doubles-brins, des liaisons croisées ADN-ADN et des liaisons croisées ADN-protéines. Par exemple, il a été constaté que l'administration de métaux lourds pouvait réduire de façon conséquente le nombre de lésions de l'ADN des lymphocytes thymiques et la peroxydation des lipides chez des souris exposées à des rayonnements γ (Osipov et al. 2003). Par ailleurs, de nombreuses espèces de bactéries ont des réponses adaptatives qui les protègent contre la toxicité et la mutagenicité des agents alkylant l'ADN (Sedgwick et Lindahl 2002).

Le mécanisme précis de la réponse adaptative radio induite est encore sujet à débat, une revue des études expérimentales semble suggérer que la voie de transduction du signal MAPK ainsi que la voie de la protéine P53 sont essentielles à son apparition.

Contrairement à la réparation immédiate après dommage à l'ADN, la réponse adaptative se développe comme une réponse relativement lente, sur plusieurs heures pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines ou mois.

La réponse adaptative est étroitement liée à l'hormèse, cette dernière serait la première réponse à l'exposition à des doses d'irradiation menant à une réponse adaptative. Certains des effets stimulants entraînent une réponse adaptative après une exposition ultérieure à une dose plus élevée. C'est pourquoi, dans la plupart des cas, les doses de réponse adaptative sont également efficaces pour induire l'hormèse (Olivieri 1999).

Ces deux phénomènes peuvent être induits par une irradiation à faible dose. La plage de dose optimale pour l'induction d'une réponse adaptative est la même que pour l'induction de l'hormèse (Luckey 2020). La différence principale entre ces deux processus est que la réponse adaptative ne se produit que lorsque

les organismes adaptés sont irradiés à des doses de rayonnements qui sont relativement élevées, tandis que l'hormèse ne nécessite pas l'exposition à des doses fortes pour apparaître. En termes de mécanismes, ces deux réponses partagent un grand nombre de points communs (Ikushima 1999).

6. Lien avec la pathologie athéromateuse

Il est connu que l'exposition du cœur à de fortes doses de rayonnements ionisants provoque des lésions cardiaques et augmente le risque de survenue de maladies cardiovasculaires. Des travaux épidémiologiques ont notamment mis en évidence ces risques par des études de cohorte sur des patients traités par radiothérapie dans le cancer du sein (Darby et al. 2003; Hoving et al. 2008), la maladie de Hodgkin (Boivin et al. 1992; Adams et al. 2004), ou le cancer infantile (Mulrooney et al. 2009). Des études portant sur des survivants des bombardements atomiques d'Hiroshima et Nagasaki ayant été irradiés ont également démontré de tels risques (Wong et al. 1999).

Par contraste, les effets des faibles doses et leur conséquence sur les maladies cardiovasculaires font encore l'objet d'incertitudes. Traditionnellement, les maladies non cancéreuses n'étaient pas considérées comme des risques pour la santé après une exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants. En effet, les maladies non cancéreuses sont classées comme des réactions tissulaires déterministes, qui se caractérisent par une dose seuil. On estime qu'en dessous d'une dose absorbée de 100 mGy, aucune lésion tissulaire cliniquement pertinente ne se produit, ce qui constitue la base du système actuel de radioprotection concernant les effets non cancéreux. De récentes découvertes épidémiologiques indiquent toutefois un risque excessif de maladies non cancéreuses suite à une exposition à des doses de rayonnements ionisants plus faibles que ce que l'on pensait auparavant. Les preuves sont les plus robustes concernant les maladies cardiovasculaires et la cataracte.

Néanmoins, en raison de limite statistique, la relation dose-risque reste incertaine pour des doses inférieures à 0,5 Gy (Radiation Protection No 158 2008); les études expérimentales sont ainsi un moyen de compléter les données épidémiologiques avec les mécanismes biologiques et moléculaires sous-jacents.

Ainsi, lors de ces travaux, nous nous sommes focalisés sur une pathologie cardiovasculaire précise qui est l'athérosclérose. Elle est la principale cause des maladies coronariennes et des accidents vasculaires cérébraux, les deux principales causes de décès dans les sociétés développées. Dans la partie suivante, le processus physiopathologique de cette maladie est détaillé.

II. Athérosclérose

1. Généralités

Les maladies cardiovasculaires sont une des premières causes de mortalité dans le monde. L'athérosclérose est ainsi la première cause de survenue d'évènements pathologiques vasculaires, tels que les maladies coronariennes, l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les maladies artérielles périphériques.

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des artères de gros et moyens calibres. Celle-ci est la résultante de l'interaction entre les lipoprotéines modifiées, les macrophages dérivés de monocytes circulants, les lymphocytes T et les éléments cellulaires de la paroi artérielle (Bonnet 2005). L'inflammation chronique engendrée va conduire à une réaction de cicatrisation de la paroi artérielle aboutissant à la formation de lésions. Cette cicatrisation de la lésion va favoriser sa stabilité au cours du temps. Cependant certaines lésions inflammatoires sont trop importantes ou trop brutales entraînant la complication des lésions par une rupture ou érosion de la plaque. Cela conduit à l'apparition d'une thrombose artérielle qui peut aboutir à une obstruction brutale du vaisseau et la survenue d'infarctus du myocarde ou d'AVC.

2. Épidémiologie

L'athérosclérose est une pathologie très répandue au niveau mondial, mais depuis le milieu du XXe siècle dans les pays à revenus élevés il a été constaté une baisse spectaculaire de l'incidence et de la mortalité des cardiopathies ischémiques et des accidents vasculaires cérébraux ischémiques (Figure 13). Au Royaume-Uni, la probabilité de décès d'un homme d'âge moyen est passée de 22% en 1950 à 6% en 2010 (Herrington William et al. 2016).

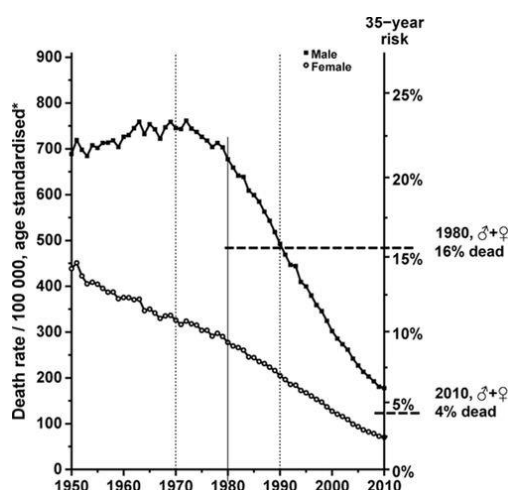


Figure 13 Taux de mortalité par maladie vasculaire chez les 35 à 69 ans, par sexe au Royaume-Uni entre 1950 et 2010 (Herrington William et al. 2016).

Les pays à plus faibles ou moyens revenus signalent aussi une baisse générale des AVC au cours des dernières décennies, cependant les cardiopathies ischémiques sont en hausse dans certains pays comme en Europe de l'est ou en Asie. Des facteurs de risques modifiables favorisant l'athérosclérose sont maintenant clairement identifiés (nous y reviendrons dans une partie ultérieure). L'évolution générale des comportements en matière de santé et l'utilisation de traitements préventifs pour prévenir ces facteurs de risque ont été déterminants pour expliquer cette baisse de la mortalité cardiovasculaire dans les pays à haut niveau de revenus.

3. Physiopathologie

Il s'agit d'une pathologie dont la progression est lente, caractérisée par une inflammation chronique avec une accumulation de plaques hautement chargées en lipides au sein des artères de grands et moyens calibres

A. Stades de progression

Sous l'égide de l'association de cardiologie américaine (*American heart association*), les lésions artérielles d'athérosclérose ont été classées en six stades. Ils sont énumérés ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 Classification de Stary.

Nomenclature et type histologique	Stades de progression	Mécanisme de croissance principal	Date de début d'apparition	Corrélation clinique
Type I : Macrophages isolés spumeux		Par accumulation lipidique	Dès 10 ans	Asymptomatique
Type II : stries lipidiques			Dès 30 ans	
Type III (intermédiaire) Type II avec accumulation de lipides extracellulaires				
Type IV (athéromateux) : Formation d'un centre lipidique sans fibrose		Dès 40 ans		Asymptomatique ou symptomatique
Type V : fibro athérome, avec ou sans calcifications				
Type VI : athérosclérose compliquée			Augmentation du collagène et des cellules musculaires lisses	
		Thrombose, hématome		

i. Lésions de type I ou lésions initiales

Ce sont des lésions microscopiques, présentes essentiellement chez les enfants et les adolescents. Elles sont caractérisées par une infiltration, dans l'intima, de cellules spumeuses qui sont à l'origine des macrophages mais en petit nombre. L'accumulation de ces cellules dans l'intima va induire une augmentation nette de l'adhésion de monocytes à l'endothélium et favoriser l'évolution vers le stade II de ces lésions.

ii. Lésions de type II ou stries lipidiques

Elles sont caractérisées par une accumulation dans la couche sous-endothéliale de l'intima de macrophages spumeux en petits amas formant des lésions appelées les stries lipidiques. En plus des macrophages, certaines cellules musculaires lisses contiennent aussi des dépôts lipidiques, mais les cellules spumeuses d'origine macrophagique prédominent par rapport aux cellules musculaires lisses. Quelques lymphocytes T sont également détectés dans ces lésions. Les lipides présents sont surtout à l'intérieur des cellules et sont essentiellement de trois types ; les esters de cholestérol (77 %), le cholestérol et les phospholipides. Une très faible quantité de lipides se retrouve parfois dispersée à l'extérieur des cellules mais les lésions de type II se caractérisent plutôt par l'absence de lipides extracellulaires. On peut distinguer les lésions de type IIa, les plus rares, qui donnent naissance aux lésions de type III. Elles se distinguent par la présence de plusieurs couches superposées de cellules musculaires lisses. Les lésions de type IIb contiennent peu de cellules musculaires lisses et ne progressent pas ou progressent seulement chez les sujets avec une concentration très élevée en lipoprotéines athérogènes. Les lésions de type I et II sont observées avec une incidence élevée chez les sujets de 1 an, leur fréquence va ensuite diminuer durant l'enfance puis augmenter à nouveau lors de l'adolescence.

iii. Lésions de type III ou pré athéromateuses

Ce sont des lésions intermédiaires entre les lésions de type II et de type IV, qui apparaissent entre 10 et 20 ans. Elles sont caractérisées par des gouttelettes lipidiques extracellulaires plus nombreuses et plus localisées que dans les lésions de type II. Ces dépôts se trouvent à proximité des couches de macrophages et macrophages spumeux. Le core lipidique n'est à ce stade pas encore développé.

iv. Lésions de type IV ou athéromateuses

Ces lésions sont caractérisées par une augmentation des pools de vésicules lipidiques extracellulaires, qui à confluence fusionnent pour former le core lipidique. Elles sont présentes chez l'adulte jeune. Ce centre lipidique précède la formation du tissu fibreux et désorganise profondément la structure de l'intima. Les macrophages, les cellules spumeuses et les lymphocytes sont concentrés à la surface de la lésion. Ces lésions peuvent évoluer soit vers la plaque fibreuse (type V) ou la plaque rompue (type VI).

v. Lésions de type V ou fibro-atheromateuses

La lésion de type V correspond typiquement à la définition de l'OMS de l'athérosclérose. Ces lésions apparaissent après 40 ans. Elles sont caractérisées par la production de tissu fibreux dans l'intima qui en entourant le centre nécrotique forme la chape fibreuse. Il existe 3 sous-types de lésions : les lésions de type Va comportent une chape fibreuse épaisse entourant plusieurs centres lipidiques. Les lésions de type Vb présentent des calcifications s'accumulant préférentiellement dans les centres nécrotiques, avec une chape fibreuse bien présente. Enfin les lésions de type Vc sont essentiellement fibreuses, et ne comportent pas de centres nécrotiques, de cellules inflammatoires ou de lipides. Les lésions de type V entraînent généralement une sténose artérielle, sans retentissement pour un gros vaisseau (aorte), mais pouvant induire une sténose significative des artères de moyens calibres telles que les coronaires ou les carotides.

vi. Lésions de type VI dites « compliquées »

Ce type de lésions est responsable de la grande majorité des événements aigus, elles surviennent généralement après 40 ans. Ces lésions suivent les lésions de type IV ou V et peuvent présenter plusieurs aspects. Les lésions de type VIa se caractérisent par l'apparition de fissures à la surface de la lésion. Les lésions de type VIb sont caractérisées par l'apparition d'une hémorragie ou d'un hématome intra-plaque. La survenue de ces hémorragies est principalement due à la rupture de néo vaisseaux sous l'effet de contraintes hémodynamiques. Enfin, les lésions de type VIc sont caractérisées par l'apparition d'une thrombose. Un schéma représentant l'évolution de plaque en fonction des lésions est représenté ci-dessous (Figure 14).

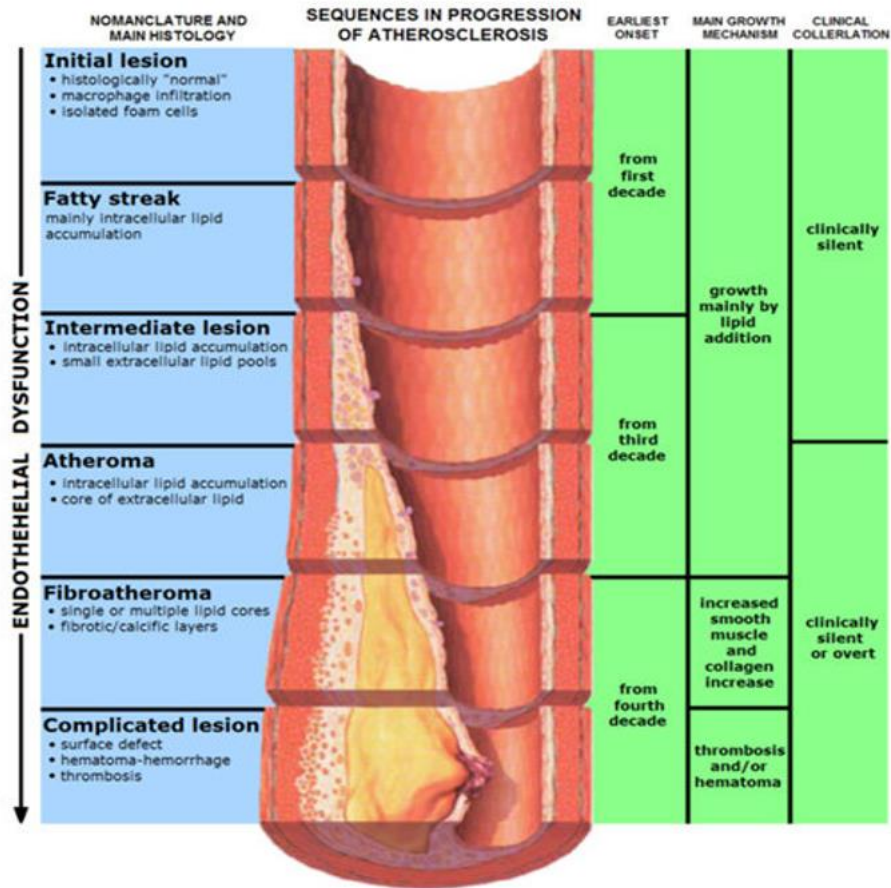


Figure 14 Séquences de progression de l'athérosclérose (Houston 2013).

B. Facteurs de risque et prévention

Il existe deux types de facteurs de risque de l'athérosclérose (Owen et al. 2011; Ross 1993; Weber et Noels 2011) :

Les facteurs non modifiables :

- ✓ Age (le risque augmente avec l'âge)
- ✓ Sexe (risque plus élevé pour le sexe masculin)
- ✓ Antécédents familiaux

Les facteurs modifiables :

- ✓ Dyslipidémie : hypercholestérolémie
- ✓ Tabagisme
- ✓ Hypertension artérielle
- ✓ Diabète
- ✓ Obésité

La **prévention primaire** est le moyen de prévenir l'apparition et le développement de l'athérosclérose. Elle doit être mise en œuvre en fonction de l'évaluation du risque global qui tient compte de l'ensemble des facteurs de risque. Celle-ci est mise en œuvre par des mesures hygiéno-diététiques comprenant : la réduction de la charge pondérale, l'arrêt complet de l'intoxication tabagique, de l'exercice physique régulier et une alimentation type « méditerranéenne ». Ainsi la correction de chaque facteur de risque passe par des mesures hygiéno-diététiques propres, mais aussi par un traitement médicamenteux guidé par les recommandations. Le patient à « haut risque » (>20% de risque de déclencher un évènement cardiovasculaire) nécessite un traitement antiplaquettaire par aspirine (75-100 mg).

La prévention secondaire s'adresse aux patients porteurs d'une athérosclérose. Le dépistage de l'ensemble des localisations de l'athérosclérose est important (coronaires, carotides, aorte et membres inférieurs), ainsi que la recherche des facteurs de risque. Le traitement passe par des mesures hygiéno-diététiques, la prise en charge des facteurs de risque avec des cibles thérapeutiques plus strictes qu'en prévention primaire.

- Un traitement médicamenteux qui comporte, sauf contre-indication et pour une durée indéterminée des Antiplaquettaire : aspirine ou clopidogrel
- S'il y a plus d'une localisation de l'athérosclérose, des statines : valeur cible du LDL < 1g.L⁻¹
- Inhibiteur de l'enzyme de conversion pour des patients coronariens, diabétiques, hypertendus ou patients avec plus de 2 facteurs de risques)

Enfin, le suivi de l'application des traitements et particulièrement l'obtention des cibles thérapeutiques font partie de la surveillance, ainsi que la recherche d'une progression des lésions.

C. Etapes de formation de la plaque d'athérosclérose

i. Formation de stries lipidiques

La formation de stries lipidiques est le 1^{er} signe de l'athérosclérose. Ces lésions initiales ont majoritairement pour origine une augmentation locale de la concentration en lipoprotéines dans l'espace intimal artériel (Tavafi 2013). Dans les phases initiales de la formation de la plaque d'athérome, les plaques progressent traditionnellement dans la direction opposée des vaisseaux. Lorsqu'une plaque occupe plus de 40 % de la composante élastique interne du vaisseau on considère que le canal artériel est occupé. La fin de vie d'une plaque d'athérome est caractérisée par l'obstruction du flux sanguin. L'athérosclérose est la résultante de dommages dans l'intima avec une réponse cellulaire impliquant les monocytes, les cellules musculaires lisses (CML) et les lymphocytes. Les lésions initiales sont composées de cellules spumeuses, et de dépôts extracellulaires de lipides et d'un petit nombre de plaquettes. Au fur et à mesure du temps, les CML prolifèrent et dans les phases finales, intensifient l'hémorragie dans la plaque (Tavafi 2013; Owen et al. 2011; Nasri 2012; Weber et Noels 2011; Nayer et Ortega 2014; Behradmanesh et Nasri 2012).

Capture des lipoprotéines à faible densité ou LDL

La première étape dans la genèse de l'athérosclérose est le piégeage des LDL dans les sites de lésion, qui pénètrent les cellules endothéliales par endocytose. Les LDL circulants interagissent naturellement avec l'endothélium capillaire dont l'un des rôles est de faciliter le transport des lipoprotéines et autres composants solubles vers les tissus périphériques. Cependant un taux plasmatique élevé de LDL va engendrer un gradient de concentration, des facteurs hémodynamiques vont favoriser une accumulation locale de LDL et induire une augmentation de la perméabilité endothéliale de ces lipoprotéines (Figure 15). Lorsque l'équilibre de concentration entre LDL plasmatique et intracellulaire au niveau de la paroi artérielle est rompu en faveur d'une hausse du LDL plasmatique, cela entraîne une hausse du piégeage des lipoprotéines dans l'intima artériel. Ce piégeage entraîne une augmentation de la concentration de LDL intimal, et une présence prolongée au sein des lésions. Ces deux éléments favorisent une oxydation des particules lipidiques piégées (Tavafi 2013).

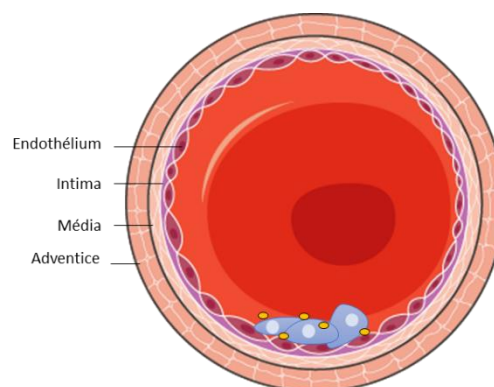


Figure 15 Dysfonction endothéliale : Hausse de la perméabilité - Migration et adhésion accrue des monocytes.

Activation des cellules endothéliales

En parallèle des étapes initiales, des leucocytes, monocytes et lymphocytes T entrent en contact avec l'endothélium. Cette étape nécessite l'intervention de molécules d'adhésion de leucocytes et de chimiokines dont l'expression est favorisée par la voie $\text{NF}\alpha\beta$. Il s'agit d'un facteur de transcription qui devient actif avec la liaison de cytokines aux récepteurs des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales deviennent donc actives en produisant de nombreuses molécules d'adhésion. Ces molécules d'adhésion sont composées de diverses sélectines, molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM), et molécules d'adhésion vasculaire (VCAM) (Springer 1996). Elles entraînent la production de molécules attractantes ou chimiokines qui vont faciliter la migration et l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (Erl, Weber, et Weber 1998). De plus des chimiokines spécifiques favorisent la migration de CML et de cellules endothéliales. Nous pouvons notamment citer le « monocyte chemokine protéine-1 » ou MCP-1 qui est considérablement exprimé par les macrophages et dans une moindre mesure par les CML et l'endothélium. MCP-1 est exprimé durant toutes les étapes de l'athérosclérose. Sa surexpression favorise une diapédèse des monocytes et entraîne leur transmigration à travers la barrière endothéliale et leur infiltration dans les lésions (Rafieian-Kopaei et Baradaran 2013). L'activation des cellules endothéliales est illustrée dans la figure ci-dessous (Figure 16).

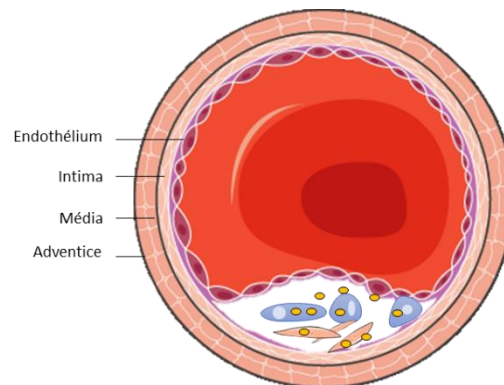


Figure 16 Migration des CML de la média vers l'intima et activation des cellules endothéliales.

Formation de cellules spumeuses

Les monocytes se différencient en macrophages après leur infiltration dans l'intima. Leur rôle phagocytaire peut permettre de prévenir l'athérosclérose par la phagocytose de lipides extracellulaires. De plus certains macrophages ayant accumulé les lipides dans leur cytoplasme peuvent être amenés à quitter la paroi artérielle et retirer les lipides de l'artère. Cependant, si la balance des entrées et des sorties de lipides penchent en faveur des entrées, cela résultera en l'accumulation de lipides et leur tendance à former des plaques d'athérome sera augmentée. Les macrophages internalisent et accumulent les LDL oxydés par leurs récepteurs scavengers qui ensuite se convertissent en cellules spumeuses. (Steinbrecher et al. 1984) L'expression de ces récepteurs est augmentée lors de la différenciation des monocytes en macrophages. Elle est aussi facilitée par les macrophages colony stimulating factor ou M-CSF (Steinbrecher et al. 1984). Par la suite, certaines cellules spumeuses localisées dans les lésions vont mourir par apoptose. Cette mort provoque l'apparition de corps nécrotiques riches en lipide favorisant le développement de la plaque d'athérosclérose. Les monocytes ne font pas uniquement que se différencier en cellules spumeuses, ils produisent également des substances cytotoxiques comme le facteur de nécrose tumorale (TNF), des facteurs de croissances, des substances de coagulations, et des radicaux libres. Ces substances causent des dommages additionnels à l'endothélium et une oxydation accrue des LDL, ce qui accentue les changements métaboliques (Corsini et al. 1996) (Figure 17).

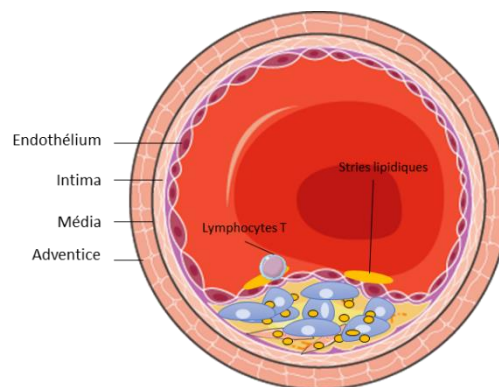


Figure 17 Phagocytose des lipides par les macrophages.

ii. Formation de la plaque l'athérome

Les lésions deviennent sévères lorsque des cellules musculaires lisses adjacentes et des cellules endothéliales sécrètent des cytokines et des facteurs de croissances comme l'IL-1 et TNF. Ces facteurs entraînent une migration des CML vers la lumière du vaisseau. Dans ces conditions, la migration des CML et la synthèse de matrice extracellulaire forment la chape fibreuse. Cette chape est composée de fibres riches en collagène, de cellules musculaires lisses, de macrophages et de lymphocytes T. Tous ensemble, ils forment la plaque d'athérosclérose mature qui, gonflant dans le canal artériel, réduit le flux sanguin des vaisseaux (Rafieian-Kopaei et Baradaran 2013). Il y a également des macrophages et des lymphocytes T localisés en bordure de plaques développées. Les macrophages sécrètent des métalloprotéases, qui contribuent à la lyse de la matrice extracellulaire. Les cellules T produisent du $TNF\alpha$, qui prévient la synthèse de collagène dans les cellules musculaires lisses. Ces événements affaiblissent la plaque formée de la chape fibreuse et peuvent potentiellement la détruire. Sa destruction expose le

collagène et le lipide au flux sanguin ce qui entraîne une accumulation et une adhésion de plaquettes, la formation d'un caillot sanguin qui peut potentiellement bloquer le flux sanguin (Steinbrecher et al. 1984; Corsini et al. 1996; Nayer et Asif 2013; Ross 1993). Le schéma ci-après (Figure 18) reprend l'ensemble des étapes d'évolution de la plaque d'athérosclérose. Depuis la hausse de la perméabilité endothéliale, jusqu'à la rupture de plaque.

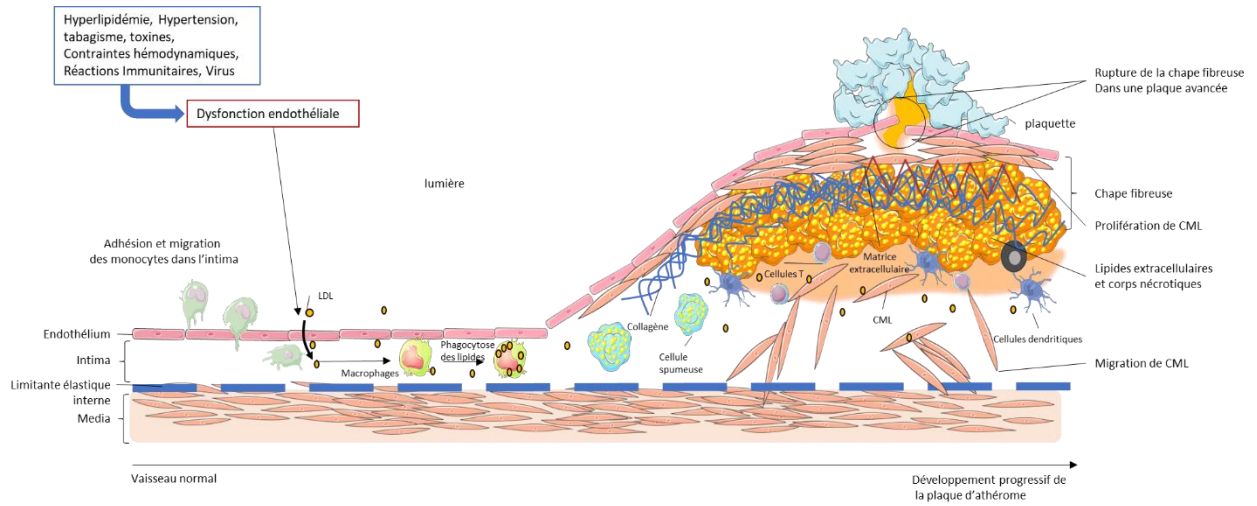


Figure 18 Formation et évolution d'une plaque d'athérosclérose (Rafieian-Kopaei et al. 2014).

4. Modèles d'étude de l'athérosclérose

Dans le cas de l'athérosclérose, un bon modèle de recherche partage les caractéristiques cruciales de la progression de la pathologie avec l'homme ainsi que la topographie des lésions. Cependant, bien que plusieurs espèces animales forment des plaques artérioscléreuses après une diète riche en cholestérol, la topographie des lésions n'est pas toujours similaire à l'humain. Il est également important de noter que la majorité des modèles animaux ne développent pas de complications telles que celles observées chez l'humain comme la rupture de plaque, l'infarctus du myocarde, l'AVC ou la mort subite.

Au cours des dernières décennies, la souris est devenue un modèle incontournable d'étude de l'athérosclérose, grâce à sa vitesse de reproduction, sa facilité de manipulation génétique, et sa capacité à enclencher le processus d'athérogène dans un délai raisonnable. Un des modèles de souris mimant l'athérosclérose le plus connu et très utilisé est le modèle ApoE^(-/-) obtenu par l'inactivation du gène de l'apolipoprotéine E (Piedrahita et al. 1992).

L'apolipoprotéine ApoE^(-/-) est une glycoprotéine principalement synthétisée dans le foie et le cerveau, elle est un composant de toutes les lipoprotéines à l'exception des LDL. C'est un ligand des récepteurs aux lipoprotéines dont la fonction est le catabolisme des chylomicrons et des VLDL. Ainsi, les souris ApoE^(-/-) sont déficitaires dans leur capacité à évacuer convenablement les lipoprotéines plasmatiques. Cela se confirme par la mesure du taux de cholestérol plasmatique à 400-600 mg.dl⁻¹ chez les souris ApoE^(-/-) avec une diète normale, en comparaison avec les souris « Wild type » qui présentent un taux de 75-110 mg.dl⁻¹ (Nakashima et al. 1994a). Ce changement est dû à une augmentation des particules VLDL. Cette hypercholestérolémie, même avec alimentation normale, suggère qu'en l'absence d'un stimulus environnemental, la déficience en ApoE^(-/-) est suffisante pour entraîner des changements massifs dans le métabolisme des lipoprotéines. L'ensemble des lésions liées à l'athérosclérose sont présentes dans ce modèle. Les plaques d'athérosclérose se forment dans certaines zones des branches vasculaires (Nakashima et al. 1994b), en prédilection dans la racine de l'aorte, la courbure inférieure de l'arc aortique et les principales branches de l'aorte (Nakashima, Plump et al. 1994). Enfin les événements séquentiels de formation de la plaque sont fortement similaires à ceux trouvés chez l'homme.

Ce modèle comporte néanmoins des limites. Tout d'abord ApoE^(-/-) est une protéine multifonctionnelle, ayant un rôle dans l'inflammation, l'oxydation, le transport inverse du cholestérol par les macrophages et la prolifération et migration des cellules musculaires lisses. Ces fonctions pourraient affecter le développement de plaques d'athérosclérose indépendamment des concentrations en lipides plasmatiques. De plus, c'est la concentration en lipoprotéines plasmatiques de type VLDL qui est augmentée de façon majoritaire chez les souris ApoE^(-/-), tandis que dans l'espèce humaine, il s'agit du LDL. Enfin la limitation majeure est la rareté de rupture de plaque et de thrombose (Plump et Lum 2009), phénomène à contrario fréquemment observé chez l'humain, pouvant mener à l'AVC et l'infarctus du myocarde.

En plus du modèle murin ApoE^(-/-) il existe d'autres modèles de souris d'études de l'athérosclérose dont une liste non exhaustive est décrite ci-dessous (Tableau 3). D'autres espèces animales comme le cochon, le rat, ou le lapin sont également utilisées mais ne seront pas traitées.

Tableau 3 Aperçu des modèles murins d'étude de l'athérosclérose (Veseli et al. 2017).

Modèle		Profil lipidique	Caractéristique de la plaque	Avantages et limites
ApoE^(-/-)	Gène ApoE perturbé	VLDL (++) LDL (+) HDL (-)	Cellules musculaires lisses Matrice extracellulaire Cellules inflammatoires Cœur nécrotique	Développement d'athérosclérose avec diète standard Profil lipidique différent de l'humain ApoE joue un rôle dans l'inflammation-> influence l'environnement de la plaque Pas de ruptures spontanées de plaque, de thrombose et de complications.
LDLr^(-/-)	Gène du récepteur au LDL perturbé	VLDL (+) LDL (++) HDL (=)	Cellules musculaires lisses Matrice extracellulaire Cellules inflammatoires Cœur nécrotique	Développement d'athérosclérose avec diète standard ApoE fonctionnel→ absence d'impact sur l'inflammation. Requière une diète contrôlée Pas de ruptures spontanées de plaque, de thrombose et de complications.
ApoE^(-/-) LDLr^(-/-)	Gène ApoE et du récepteur au LDL perturbé	VLDL (++) LDL (++) HDL (-)	Cellules musculaires lisses Matrice extracellulaire Cellules inflammatoires Cœur nécrotique	Développement d'athérosclérose avec diète standard Pas de ruptures spontanées de plaque, de thrombose et de complications.
ApoE 3-Leiden		VLDL (++) LDL (+) LDL (+) HDL (+) seulement chez WT	Cellules musculaires lisses Matrice extracellulaire Cellules inflammatoires Cœur nécrotique	ApoE fonctionnel→ absence d'impact sur l'inflammation. Requière une diète contrôlée Pas de ruptures spontanées de plaque, de thrombose et de complications
PCSK9-AAV		VLDL (+) LDL (+) HDL (=)	Cellules musculaires lisses Matrice extracellulaire Cellules inflammatoires Cœur nécrotique	Absence de modifications géniques Requière une diète contrôlée Pas de ruptures spontanées de plaque, de thrombose et de complications.
ApoE^(-/-)Fbn1^{C1039G/+/-}	Souris ApoE avec une mutation du gène de la fibrine	VLDL (++) LDL (+) HDL (-)	Cellules musculaires lisses (-) Matrice extracellulaire (-) Cellules inflammatoires (+) Cœur nécrotique (+) Néo vascularisation et hémorragie	Développement de la plaque accéléré Rupture de plaque spontanée avec complications (IM, AVC, mort subite) Néo-vascularisation intra plaque et présence d'hémorragie Les souris mâles avec une diète contrôlée meurent par rupture d'anévrisme.

III. Athérosclérose et le système immunitaire

Dans la partie précédente, nous avons décrit les grandes étapes qui constituent la formation d'une plaque d'athérome. Nous allons maintenant discuter du système immunitaire et son rôle dans cette pathologie. Il convient de dire que le système immunitaire inné joue un rôle majeur dans l'athérosclérose. Il s'agit de la première ligne de défense de l'artère, impliquant tout d'abord les cellules endothéliales, puis dans un second temps les monocytes et macrophages avec la survenue de l'inflammation. Ces réponses innées sont essentielles dans l'initiation de l'athérosclérose. Ensuite l'immunité adaptative joue également un rôle en tant que régulateur clé de la réponse inflammatoire (Libby, Ridker, et Hansson 2009). Les réponses immunitaires antigène-spécifiques ont un rôle important dans l'athérogenèse. Nous allons dans cette prochaine partie reprendre les fondamentaux du système immunitaire puis voir comment ces acteurs immunitaires sont impliqués dans l'athérosclérose.

1. Préambule

L'immunité correspond à la capacité d'un hôte à résister à un pathogène qui autrement le détruirait. Le corps humain est en permanence exposé à des organismes par inhalation, ingestion ou par contact. Ceci va permettre la pénétration d'un pathogène dans le corps et déclencher une maladie. Le système immunitaire est un réseau interactif d'organes lymphoïdes, de cellules, de facteurs humoraux et de cytokines. On peut distinguer deux sortes de systèmes immunitaires, en fonction de la vitesse et de la spécificité de la réaction. Il s'agit de l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles ne sont pas indépendantes, et interagissent entre elles. L'immunité innée est très conservée dans la nature, son action est rapide mais peu spécifique, ce qui peut parfois conduire à des dommages parmi les tissus sains. L'immunité adaptative consiste en une réponse antigène-spécifique grâce aux lymphocytes T et B. Elle détient une mémoire permettant en cas de second contact avec un antigène d'entraîner une réponse plus rapide et plus vigoureuse qui néanmoins n'est pas immédiate.

2. Système immunitaire inné

Le système immunitaire inné est composé d'éléments qui sont déjà présents dans l'organisme avant la manifestation d'une infection. Ils incluent les barrières physiques de défense ainsi que les facteurs qui reconnaissent des classes de molécules fréquemment rencontrées chez les agents pathogènes envahissants. Les mesures de défense du système immunitaire inné permettent de contenir les organismes, tandis que la réponse immunitaire adaptative est soit nouvellement générée soit restimulée.

A. Fonction générale

Le système immunitaire inné exerce son activité grâce aux monocytes sanguins, aux macrophages tissulaires et aux neutrophiles qui phagocytent et tuent les microorganismes grâce à de nombreux mécanismes de digestion complexes. Les bactéries ou agents étrangers, se fixent aux membranes cellulaires et sont ingérés dans des vésicules phagocytaires. Les phagosomes fusionnent avec les lysosomes où des enzymes lysosomales digèrent les microorganismes capturés. Les dommages qui sont engendrés par l'entrée du microorganisme conduisent à la libération de facteurs chimiotactiques pour signaler des changements dans le système vasculaire proche, ce qui permet l'extravasation de cellules polymorphonucléaires vers le site de l'inflammation. Cette réaction stéréotypée fut décrite il y a plus de 2000 ans par Celsus par ces 4 caractéristiques : rubor (rougeur), calor (chaleur), tumor (gonflement), et dolor (douleur).

B. Récepteurs de reconnaissance de motifs nucléaires (PRR)

Les monocytes et macrophages expriment à leur surface des récepteurs qui reconnaissent de larges motifs structuraux hautement conservés au sein des espèces microbiennes. Ces récepteurs sont appelés récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR). L'engagement de ces récepteurs conduit à un déclenchement immédiat des voies de signalisation qui favorisent la phagocytose, évènement nécessitant la polymérisation de l'actine et de la myosine. De nombreux facteurs contribuent à préparer les particules à l'engloutissement et ciblage pour destruction, notamment diverses opsonines composées d'éléments du complément. Une famille unique de récepteurs membranaires appelés les « Toll-Like-receptors » ou « TLR » ont un rôle très important pour la reconnaissance de composants bactériens (membranes cellulaires, Lipopolysaccharide ou LPS, acides nucléides...). L'engagement de la phagocytose intervient par l'interaction avec des récepteurs initiant une réponse inflammatoire locale ou systémique. Les TLR régulent à la fois la durée et l'intensité de la réponse inflammatoire.

Le processus de phagocytose consiste en la compartimentalisation du pathogène dans une vacuole intracellulaire appelée le phagosome. Le phagosome fusionne avec les lysosomes intracellulaires pour former une vacuole phagolysosomale. Les lysosomes ont un pH très acide et contiennent de nombreuses enzymes lytiques, qui détruisent l'organisme pathogène cible lors de la fusion avec le phagosome. Par ailleurs, la phagocytose déclenche une explosion oxydante entraînant la production de métabolites toxiques qui facilitent la destruction de l'organisme. Ces métabolites sont notamment les oxydes nitriques (NO), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les anions superoxydes (O²⁻). Enfin il existe également un complexe cytoplasmique appelé l'inflammasome, qui utilise les PRR pour détecter les microbes et la présence d'un danger. L'inflammasome conduit en l'activation de cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18. Nous verrons plus en détail le fonctionnement de ce complexe dans le cadre de la pathologie athéromateuse. Le processus de phagocytose est schématisé ci-après (Figure 19).

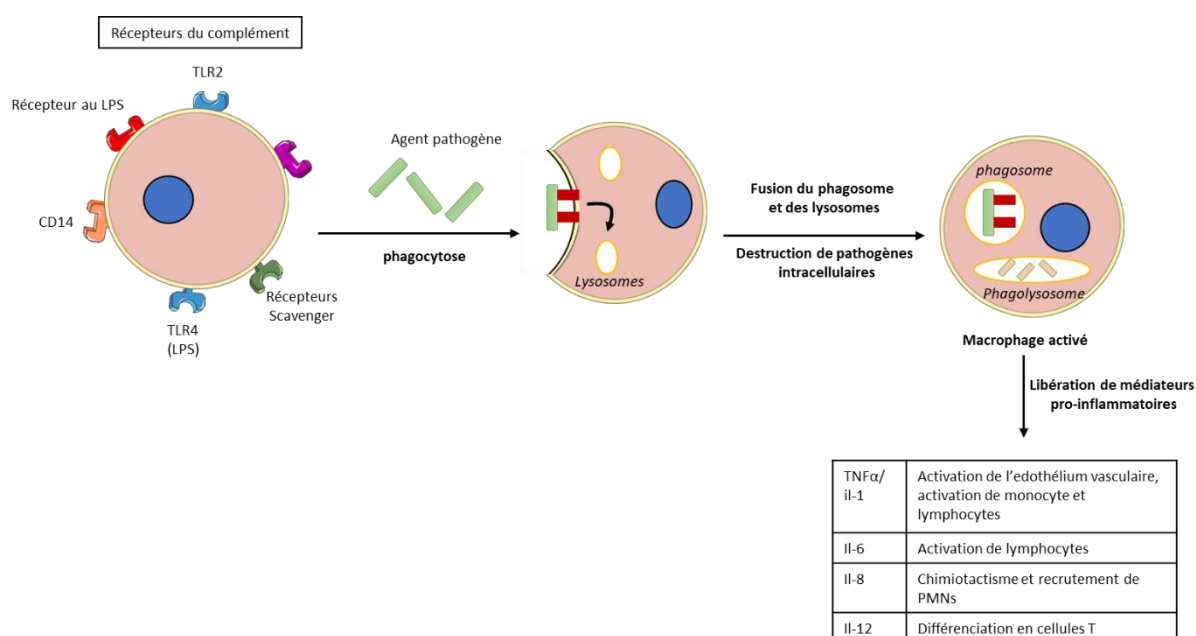


Figure 19 Processus de phagocytose et de destruction d'un pathogène.

Les types de cellules impliqués dans les réponses immunitaires innées comprennent les polymorphonucléaires (surtout des cellules neutrophiles), les monocytes et les macrophages, les éosinophiles, et les cellules appelées « natural killer » ou cellules NK. Certaines de ces cellules sont capables de tuer des cellules cibles par des moyens non spécifiques c'est-à-dire non dépendant d'un antigène ou du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) en libérant des enzymes lytiques comme de la perforine ou le facteur de nécrose tumorale (TNF). Tandis que d'autres utilisent des mécanismes de phagocytose qui tuent les microorganismes par des processus intracellulaires.

C. Système du complément

Le système du complément est un effecteur très important du système immunitaire inné et adaptatif. Le système du complément est composé de plus de 25 protéines plasmatiques et de surface cellulaire qui comprennent 3 voies d'activation (Figure 20).

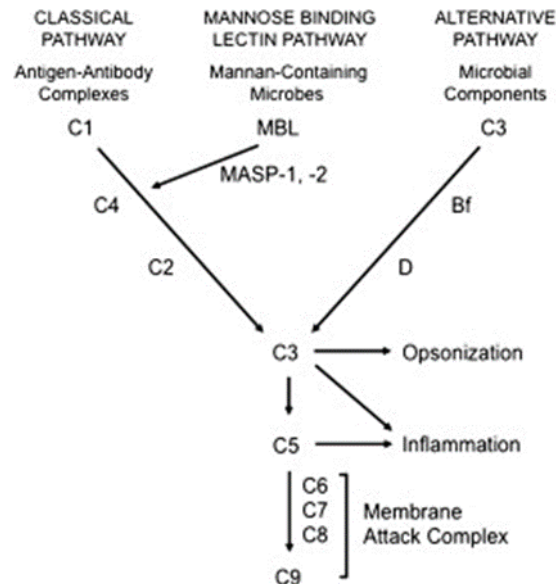


Figure 20 Voies d'activation du complément (Chaplin 2010).

De nombreuses protéines de la voie d'activation sont des protéinases, l'activation se produit en cascade par le biais de l'activation protéolytique d'un zymogène qui active le zymogène suivant dans la voie. Le principal objectif de la voie d'activation est de marquer les cibles de façon permanente pour leur destruction, de recruter d'autres protéines et cellules qui facilitent la destruction des cibles et, dans le cas de certaines bactéries et de certains virus, de participer directement au processus de destruction par lyse osmotique de l'agent pathogène.

- La voie classique est initiée par des complexes d'IgM, d'IgG1 ou d'IgG3 avec des antigènes. Cela active la protéolyse de C1 qui clive C4 et C2 pour former la voie classique de la C3-convertase.
- La 2^{ème} voie d'activation est activée sans l'intervention d'un anticorps, mais par les structures microbiennes qui désactivent la voie classique du complément.
- La 3^{ème} voie d'activation est déclenchée par des composants microbiens contenant des mannans et est appelée la voie de la lectine.

Ensemble, ces 3 voies d'activation permettent au complément de participer à la destruction et à l'élimination d'une grande variété de pathogènes et de macromolécules.

D. Neutrophiles

Les neutrophiles sont très souvent le premier type cellulaire à parvenir au site d'inflammation. Les cellules endothéliales lorsqu'elles sont activées augmentent l'expression de sélectine-E et de sélectine-P qui sont reconnues par les neutrophiles et induisent le roulement de ceux-ci le long de l'endothélium. Des chimio-attractants comme l'IL-8 ou la CXCL8 peuvent déclencher une solide adhésion puis une diapédèse des cellules leucocytaires au travers de l'endothélium. Cette chimiotaxie est en outre induite par de multiples composants du complément, de fibrinopeptides, et de leucotriènes. Les neutrophiles activés expriment notamment des récepteurs de haute affinité afin de permettre une phagocytose accrue des organismes étrangers. L'activation des neutrophiles entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène, et la libération de nombreuses granules contenant des protéases telles que des phospholipases, des élastases et des collagénases. Lors du processus de suppuration, le pus est notamment formé d'innombrables neutrophiles et de débris tissulaires.

i. Action dans l'athérosclérose

Phase d'initiation de l'athérosclérose

Les signaux chimiotactiques impliqués dans le recrutement des neutrophiles sont le CCL3 dérivé des macrophages et le CCL5 dérivé des plaquettes, qui en se liant aux récepteurs CCR1, CCR2 et CCR5 à la surface des cellules entraînent leur activation. En tant que première ligne de défense face aux pathogènes, les neutrophiles induisent des dommages tissulaires au niveau vasculaire, grâce à des enzymes comme la myéloperoxydase et la NADPH, qui peuvent induire une dysfonction endothéliale par la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Des techniques d'inhibition pharmacologique de ces enzymes ont démontré un effet atténuateur de la plaque d'athérosclérose (C. Liu et al. 2012; Kinkade, Streeter, et Miller 2013). Les granules protéiques évoquées dans la partie précédente sont également capables de conduire les monocytes auprès de la plaque d'athérosclérose en agissant comme une chimiokine (Mantovani et al. 2011). Ces éléments suggèrent un rôle important des neutrophiles dans l'initiation de l'athérosclérose (Pende et al. 2016).

Phase avancée de l'athérosclérose

Les plaques d'athérosclérose avancées ont au centre un corps nécrotique riche en débris cellulaires, une faible revascularisation des micro-vaisseaux et une chape fibreuse fine à cause de la dégradation de la matrice au fil des années. Ces plaques sont très vulnérables et encourent un risque de rupture. Aussi, des études sur des plaques humaines ont montré que le taux de collagène, marqueur de stabilité des plaques, était inversement corrélé avec la présence de macrophages et de neutrophiles (Montecucco et al. 2010). Une étude de cohorte de Ionita et son équipe (Ionita et al. 2010) a montré qu'une forte concentration en neutrophiles dans les plaques était associée à une hausse de paramètres favorisant une rupture de plaque. Enfin une étude de Naruko et son équipe (Naruko et al. 2002) a montré que les lésions responsables du syndrome coronarien aigu étaient fortement infiltrées par des cellules neutrophiles.

L'ensemble de ces éléments indiquent une action des neutrophiles à la phase précoce de la plaque dans le cadre de son action au sein du système immunitaire inné en réponse à la présence d'un pathogène.

Cependant, lors des phases tardives de la plaque d'athérosclérose, l'instabilité de la plaque semble être modulée par les cellules neutrophiles (Pende et al. 2016).

E. Cellules « Natural killer » (NK)

Les cellules Natural Killer sont des cellules développées dans la moelle osseuse sous l'influence de l'IL-2, de l'IL-15 et des cellules stromales. Elles ne représentent qu'une petite fraction des cellules du sang périphérique et une petite fraction des cellules lymphoïdes de la rate et d'autres tissus lymphoïdes secondaires. Les cellules NK ne possèdent pas de récepteurs spécifiques aux antigènes.

Leur activité cytotoxique est inhibée lorsqu'elles rencontrent une molécule du CMH, par l'intermédiaire de molécules de surface qui reconnaissent ces complexes. Ainsi, elles peuvent tuer les cellules qui ont abaissé leur expression de molécules du CMH. Elles disposent également de récepteurs d'activation. Ces cellules sont de puissants effecteurs anti-tumoraux et sont également efficaces pour tuer les cellules infectées par un virus.

i. Action dans l'athérosclérose

Les cellules NK sont présentes dans les plaques d'athérosclérose dans les phases précoces et tardives. L'étude de l'impact de ces cellules est complexe car il est difficile d'obtenir des modèles murins prédisposés à l'athérosclérose dont les cellules NK soient pleinement activées. Néanmoins, il a été montré que l'absence de cellules NK fonctionnelles résultait en une réduction de la formation de lésions d'athérome chez des souris $LDLr^{-/-}$ d'environ 70% (Whitman et al. 2004).

F. Monocytes

i. Généralités

Les monocytes sont des cellules appartenant au groupe des leucocytes. Ils ont la propriété de se différencier en une large panoplie de macrophages tissulaires et de cellules dendritiques (CD). Ce sont des cellules qui ont pour origine des progéniteurs myéloïdes pluripotents produits dans la moelle osseuse. Les monocytes circulants dans la circulation sanguine sont subdivisés en sous-types qui diffèrent en taille, en mobilité, dans l'expression de récepteurs, et dans la capacité à se différencier après stimulation par une cytokine ou un microbe.

Les monocytes sont directement produits dans la moelle mais ne restent pas dans ce compartiment plus de 24h. En effet les monocytes peuvent quitter leur compartiment de production pour migrer dans d'autres compartiments ou tissus par un phénomène de diapédèse. Ils ont une vie relativement longue dans la circulation sanguine, autour de 17h pour les souris et 71 heures pour les humains. Leur production dans la moelle est notamment gouvernée par des cytokines et facteurs de croissances tels que l'IL-3, le Macrophages colony stimulating factor (M-CSF) et le granulocyte macrophage stimulating factor (GM-CSF). Lors d'une inflammation, la quantité de monocytes circulants est doublée et leur demi-vie ($T_{1/2}$) diminuée de moitié. La majorité de ces monocytes excédentaires sont destinés à la zone inflammatoire.

Dans les modèles murins, les monocytes circulent dans le sang, la moelle osseuse et la rate lors de l'homéostasie (Auffray, Sieweke, et Geissmann 2009; Swirski et al. 2009). Lors de l'inflammation, les monocytes sanguins migrent vers les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes en réponse à un signal lié à une infection ou aux dommages de tissus. Ils phagocytent alors les cellules et les molécules toxiques comme les LDL-oxydés, produisent des cytokines inflammatoires et peuvent se différencier en macrophages résidents tissulaires, en cellules dendritiques ou en cellules spumeuses.

ii. Sous-types monocytaires

Dans le modèle murin, les monocytes peuvent être répartis en 2 sous-types, basés sur l'expression de récepteurs aux chimiokines et à la présence de molécules de surface spécifiques (Palframan et al. 2001a; Geissmann, Jung, et Littman 2003). Les monocytes pro-inflammatoires expriment les sous-types Ly6C, CD11b et CD115 à leur surface ainsi que de hauts niveaux de récepteurs aux chimiokines CC-2 (CCR2) et de faibles niveaux aux récepteurs aux chimiokines Cx3CR1. Ils sont communément appelés les monocytes Ly6C^{high} et représentent environ 2 à 5 % des leucocytes circulants et sont rapidement recrutés au niveau des sites d'inflammation. La chimiokine CCR2 est essentielle afin de permettre le trafic monocyttaire vers le site d'inflammation (Kurihara et al. 1997; Kuziel et al. 1997).

Le second sous-type majeur de monocyte est appelé le monocyte Ly6C^{low}. En opposition avec le monocyte précédent, il surexprime Cx3CR1 et sous exprime CCR2 et Ly6C (Palframan et al. 2001a; Geissmann, Jung, et Littman 2003). Dans la circulation sanguine, ces monocytes sont moins nombreux que les monocytes Ly6C^{high}, ils adhèrent et migrent le long de la surface des cellules endothéliales à la manière de patrouilleurs, c'est pourquoi ils sont aussi appelé monocytes « Patrolling » (Auffray et al. 2007). Un traçage de lignée et des techniques de transfert adoptif ont démontré que les monocytes Ly6C^{low} ont pour origine les monocytes Ly6C^{high} (Swirski et al. 2007; Yona et al. 2013).

Chez l'humain, les sous-types monocytaires sont basés sur l'expression de CD14 et CD16 (Ziegler-Heitbrock 2007). Les monocytes dits « classiques » (Ziegler-Heitbrock et al. 2010) forment l'équivalent humain du monocyte Ly6C^{high} expriment de grande quantité de CD14 et de faibles quantités de CD16 (CD14⁺⁺CD16⁻), tandis que les monocytes « non classiques » ont un rôle équivalent aux Ly6C^{low} et expriment peu de CD14 et sur exprime CD16 (CD14⁻CD16⁺). De façon similaire aux monocytes Ly6C, les monocytes CD14⁻CD16⁺ dérivent de CD14⁺⁺CD16⁻ par l'intermédiaire d'un monocyte transitionnel CD14⁺CD16⁺. Ces 3 populations de monocytes sont retrouvées dans la circulation sanguine, où les monocytes classiques forment environ 80 à 90 % de la population, alors que les monocytes non classiques constituent environ 2 à 10 % de la population, et les monocytes intermédiaires 2 à 5 % de la population. La classification des monocytes est résumée ci-dessous (Tableau 4).

Tableau 4 Sous-types de monocytes circulants murins et leur équivalent dans l'espèce humaine (Shi et Pamer 2011).

Sous-type	Marqueur	Récepteur au chimiokine	Fonction
Souris			
Ly6C^{High}	CD11b+CD115+ Ly6C ^{High}	CCR2 ^{high} Cx3CR1 ^{low}	Pro-inflammatoire (Geissmann, Jung, et Littman 2003)
Ly6C^{Low}	CD11b+CD115+ Ly6C ^{Low}	CCR2 ^{low} Cx3CR1 ^{high}	Patrouilleur (Auffray et al. 2007), réponse précoce (Auffray et al. 2007), réparation tissulaire (Nahrendorf et al. 2007)
Humain			
Classique	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CCR2 ^{high} Cx3CR1 ^{low}	Similaire à Ly6C ^{High} (Geissmann, Jung, et Littman 2003; Ingersoll et al. 2010; Strauss-Ayali, Conrad, et Mosser 2007)
Intermédiaire	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CCR2 ^{low} Cx3CR1 ^{high}	Pro-inflammatoire (Ziegler-Heitbrock 2007; Belge et al. 2002)
Non-classique	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	CCR2 ^{low} Cx3CR1 ^{high}	patrouilleur (Cros et al. 2010)

i. Action dans l'athérosclérose

Les monocytes n'ont pas pour unique rôle de reconstituer les macrophages tissulaires ou cellules dendritiques. Les monocytes peuvent également être recrutés dans les sites d'inflammation et avoir une activité anti-microbienne (Serbina et al. 2008). Les monocytes Ly6C^{Low} peuvent être recrutés sur les sites d'infection plus précocement que les Ly6C^{High} et participer à l'initiation de l'inflammation en libérant TNF α ou des chimiokines (Auffray et al. 2007). Cependant, dans la plupart des cas, les monocytes Ly6C^{High} sont majoritairement recrutés.

Durant la pathogenèse de l'athérosclérose, les monocytes circulants sont recrutés dans l'intima artériel et peuvent se différencier en macrophages qui accumulent les lipides et autres dérivés du cholestérol, formant les cellules spumeuses dans l'espace subintimal et à terme les stries lipidiques. L'origine des sous-types monocytaires se différenciant en macrophages formant des cellules spumeuses est encore discutée. Néanmoins il est actuellement démontré que la maladie se retrouve aggravée lorsque le nombre de monocytes Ly6C^{High} circulants augmente (Potteaux et al. 2007; Swirski et al. 2007; Tacke et al. 2007). De plus, ces sous-types monocytaires adhèrent préférentiellement à l'endothélium activé, infiltrent le vaisseau et deviennent des macrophages lésionnels. Néanmoins une étude De Rahman et son équipe suggèrent que les monocytes Ly6C^{High} peuvent se différencier en macrophages M2 et conduire à une régression de l'athérosclérose (Rahman et al. 2017). Le rôle des monocytes Ly6C^{Low} est plus sujet à débat. Tout comme son partenaire Ly6C^{High}, il est capable de phagocyter les LDL oxydés, cependant il ne semble pas être à l'origine des macrophages lésionnels, et l'inactivation du facteur de transcription Nur77 entraînait une aggravation la plaque d'athérome, qui se trouvait déficiente en monocytes Ly6C^{Low} (Hanna et al. 2012; Hilgendorf et al. 2014; Hamers et al. 2012). Bien que les monocytes soient recrutés dans la plaque pendant sa croissance, ils peuvent également émigrer de la plaque, au moins dans certaines conditions expérimentales qui sont associées à une diminution de la taille de la

plaque et, par conséquent, à une régression de l'athérosclérose (Feig, Quick, et Fisher 2009). Les monocytes peuvent pénétrer dans les vaisseaux lymphatiques puis se diriger vers le ganglion lymphatique de drainage, ou ils peuvent migrer à travers l'endothélium artériel vers la lumière de l'artère pour entrer directement dans le flux sanguin circulant (Randolph 2008). L'action des monocytes dans la plaque d'athérome est schématisée ici (Figure 21).

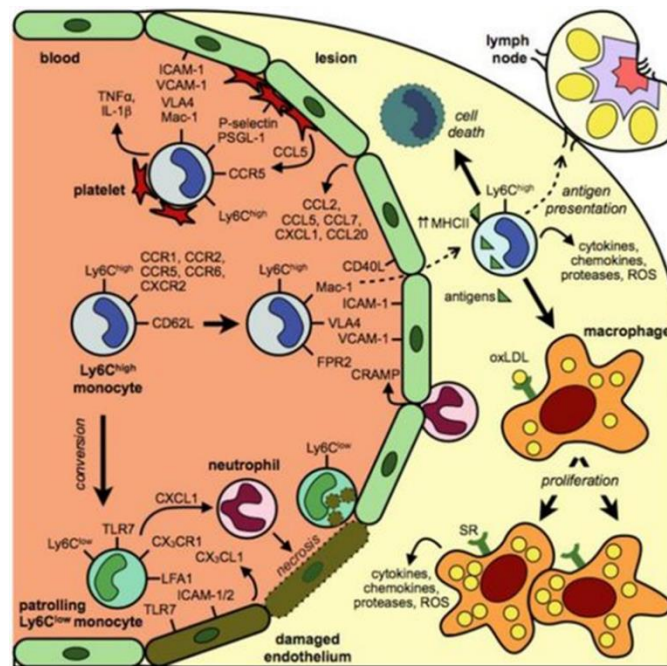


Figure 21 Interaction entre monocytes et la plaque d'athérome d'après la revue de Hilgendorf (Hilgendorf, Swirski, et Robbins 2015).

Les monocytes Ly6C^{high} sont recrutés au niveau de l'endothélium activé, grâce au guidage par les chimiokines. L'interaction avec les plaquettes et les neutrophiles favorisent l'expression de molécules d'adhésion qui facilitent l'ancrage de monocytes et la diapédèse. Les monocytes Ly6C^{high} peuvent contribuer directement à l'inflammation, se différencier en macrophages, ou même quitter la plaque via le système lymphatique afin d'exercer leur rôle de présentateur d'antigène dans les ganglions lymphatiques. Ils peuvent également mourir sur place. Les monocytes Ly6C^{high} peuvent se différencier en monocytes Ly6C^{low} qui ont un rôle de patrouilleur. Ces derniers préviennent les dommages causés à l'endothélium.

G. Chimiokines

Les chimiokines appartiennent à une famille de cytokines qui possèdent des activités de chimiotactismes vis-à-vis des différentes populations de leucocytes. Ces molécules interagissent par l'intermédiaire de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les chimiokines sont indispensables au recrutement des leucocytes circulants vers les sites inflammatoires, en participant à la fois à la migration des globules blancs et à leur activation (Samson, M-Aubry et F-Parmentier 1999). Par ailleurs, les chimiokines et leurs récepteurs jouent un rôle critique pour diriger les leucocytes vers les zones favorables au développement de lésions d'athérome. Nous allons dans cette partie, citer les chimiokines majeures qui interviennent dans le trafic monocytaire.

i. CCR2

Ce récepteur dispose de MCP-1 (CCL2) et MCP-3 (CCL7) comme ligands. Ils permettent le recrutement de monocytes Ly6C^{High} (Tsou et al. 2007a). Il y a peu de cellules qui expriment CCR2, néanmoins, CCL2 est exprimé par quasiment toute les cellules nucléées lorsqu'activées par des cytokines pro inflammatoires ou par l'apparition de particules microbiennes (Tsou et al. 2007b). CCL2 circule dans la lymphe et entre en liaison avec les veinules des ganglions lymphatiques (Palframan et al. 2001a), lui permettant de guider les monocytes jusque dans ces ganglions. CCL2 est notamment impliqué dans l'initiation de l'athérosclérose (Aiello et al. 1999).

La chimiokine CCL7 est également induit par les infections bactériennes et contribue au recrutement de monocytes Ly6C^{High} (Tsou et al. 2007b; Jia et al. 2008). Ces ligands sont essentiels au recrutement monocytaire, car une délétion de CCL2 ou CCL7 diminue le pourcentage de recrutement de monocytes par 40-50% (Jia et al. 2008).

ii. CX3CR1

Cx3CR1 se lie au Cx3CL1, une chimiokine membranaire exprimée par les tissus et dans les zones marginales de la rate, elle favorise le recrutement des monocytes Ly6C^{low}. Elle permet le recrutement précoce de monocytes patrolling vers la rate (Auffray et al. 2009). En plus de leur rôle dans le trafic monocytaire, elle fournit également un signal de survie au monocytes Ly6C^{low}, aussi bien lors d'un état basal qu'en phase d'inflammation (Auffray et al. 2009). Plusieurs études ont démontré que cette chimiokine avait un rôle pro athérogénique (Kraaijeveld et al. 2007).

iii. CxCR4

Le ligand de CxCR4, CxCL4 est produit principalement par les plaquettes, il a été montré que cette chimiokine pouvait se lier aux lipoprotéines modifiées et favoriser l'internalisation des LDL oxydés par les macrophages (Balashov et al. 1999). De plus il a été décrit pour son induction d'un macrophage distinct de M1 et M2 le macrophage M4 (Balashov et al. 1999). Ce macrophage est considéré comme pro inflammatoire et pro athérogénique (Vanbervliet et al. 2002).

iv. CxCR16

CxCL16 est importante par sa particularité d'avoir une activité similaire au récepteur scavenger. L'inhibition de CxCL16 entraîne une aggravation de l'athérosclérose, ce qui conduit à penser qu'elle a un rôle athéro protecteur. De plus elle serait impliquée dans le transport inverse de cholestérol, favorisant l'efflux de HDL.

v. CCR1 et CCR5 :

Concernant ces récepteurs, des études de transmigration *in vitro* ont montré que CCR1 participe à l'arrêt des monocytes dans des zones avec de fortes contraintes de cisaillement, et CCR5 supporte le chimiotactisme trans-endothélial vers CCL5 (Weber et al. 2001). Dans le cas de l'athérosclérose, CCR5 a

été identifié comme un agent pro athérogène (Gautier, Jakubzick, et Randolph 2009; Weber, Zerneck, et Libby 2008). Le recrutement de monocytes Ly6C^{high} vers les plaques d'athérome dans les souris ApoE^(-/-) prédisposées à l'athérosclérose est en partie régulé par CCR2, CCR5 et Cx3CR1. Quant au recrutement des monocytes Ly6C^{low}, celui-ci est en partie dépendant de CCR5 (Tacke et al. 2007).

Enfin nous pouvons citer d'autres chimiokines ; CCR6 et son ligand CCL20 semble ne pas réguler la sortie de monocytes Ly6C^{high} vers les sites d'inflammation, mais il aurait un rôle d'accompagnement dans la migration et dans la fonctionnalité de ces monocytes. CCR7 ainsi que CCR8 semblent être exprimés à la surface de monocytes qui se différencient en cellules dendritiques afin de migrer de la peau vers les ganglions lymphatiques (Qu et al. 2004). Les caractéristiques des chimiokines sont résumées ici (Tableau 5).

Tableau 5 Chimiokines impliquées dans le trafic monocyttaire (Shi et Pamer 2011).

Récepteurs aux chimiokines	Ligands	Fonction	Rôle dans l'athérosclérose
CCR2	CCL2, CCL7 et CCL12	Emigration de Ly6C ^{high} de la moelle osseuse	Favorise la venue de Ly6C ^{high} dans la plaque d'athérome. Athérogène.
Cx3CR1	Cx3CL1	Recrutement des monocytes Ly6C ^{low}	Pro athérogène
CCR1 et CCR5	CCL3 et CCL2	Recrutement dans les tissus avec inflammation.	Pro athérogène
CxCR4	CXCL4	-	-
CxCR16	CxCL16	-	Athéroprotecteur
CCR6	CCL20	Rôle possible dans la migration et la fonctionnalité de Ly6C ^{high}	-
CCR7 et CCR8	CC19 et CCL1	Migration de cellules dendritiques dérivées de macrophages de la peau vers les ganglions lymphatiques	-

H. Molécules d'adhésion

Le recrutement de leucocytes aux organes lymphoïdes secondaires et aux tissus périphériques est fondamental pour l'exercice de la défense immunitaire. Les molécules d'adhésion cellulaire sont essentielles à ce processus. Il existe 3 familles de molécules d'adhésion qui sont les sélectines, les intégrines et molécules d'adhésion du domaine des immunoglobulines. En parallèle de leur action dans le recrutement leucocytaire aux tissus, ces molécules contribuent à l'interaction cellule-cellule et permet la signalisation intercellulaire (Abram et Lowell 2009).

i. Sélectines

Les Sélectines-L sont exprimées par différentes cellules immunitaires comme les cellules T, les cellules Natural Killer et les monocytes Ly6C^{High}. Cette famille de molécule d'adhésion favorise le développement de l'athérosclérose (K. J. Woollard et Chin-Dusting 2007). Elle est essentielle dans le processus de roulement des leucocytes au niveau de l'endothélium en particulier vers les veinules endothéliales des ganglions lymphatiques (Girard et Springer 1995). Les monocytes Ly6C^{Low} n'expriment pas la Sélectine-L et ne sont ainsi pas recrutés au niveau des ganglions (Palframan et al. 2001b).

La sélectine-P est exprimée par les cellules endothéliales et par les plaquettes et interagit avec le ligand « P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) qui est exprimé par les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes (K. J. Woollard et Chin-Dusting 2007). Une inhibition des Sélectine-L chez la souris entraîne une réduction de macrophages dans les plaques et une réduction de la taille des stries lipidiques. Il existe également une forme soluble de la Sélectine-L : la Sélectine-sP, qui provient d'une Sélectine-P clivée, et dont l'action est pro inflammatoire par l'activation d'intégrines et une hausse de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (K. Woollard et al. 2006; K. J. Woollard 2005). La Sélectine-E interagit également avec PSGL-1, et favorise l'apparition des plaques d'athérome (Collins et al. 2000).

ii. Intégrines

Les intégrines sont une famille de récepteurs de surface. Ils régulent le trafic leucocytaire, la migration et la phagocytose. Ils sont très importants pour l'adhésion ferme des monocytes aux cellules endothéliales (Ley et al. 2007).

L'intégrine « α_4 -intégrin » se lie à l'« endothelial vascular cell adhesion-1 » ou VCAM-1 tandis que la β_2 -intégrin se lie à l'« intercellular adhesion molecule-1 » ou ICAM-1. Ces deux intégrines sont abondamment exprimées par les monocytes circulants (Grage-Griebenow, Flad, et Ernst 2001), néanmoins les monocytes Ly6C^{Low} expriment des niveaux plus importants en α_4 -intégrin que les monocytes Ly6C^{High} (Geissmann, Jung, et Littman 2003) ce qui leur permet de « ramper » au niveau de l'endothélium (Auffray et al. 2007).

L'expression de VCAM-1 et ICAM-1 est stimulée par les cytokines proinflammatoires et par le LDL oxydé. Ces deux molécules d'adhésion, ainsi que leurs ligands, participent à la régulation du recrutement des monocytes vers la plaque. Une hausse de leur expression a des conséquences pro-athérogène (Patel et al. 1998). Les caractéristiques des molécules d'adhésion sont résumées ici (Tableau 6).

Tableau 6 Molécules d'adhésion impliquées dans le trafic monocytaire (Shi et Pamer 2011).

Molécules d'adhésion	Ligands	Fonction	Rôle dans l'athérosclérose
CD34	Sélectine-L	Adhésion ferme et roulement à l'endothélium, migration vers les ganglions lymphatiques	-
Sélectine-P et E	PSGL1	Migration vers les veinules inflammées. Roulement et adhérence à l'endothélium au niveau des plaques d'athérosclérose	Pro athérogène.
ICAM-1	β 2-integrin, MAC1	Adhésion lors de l'inflammation (MAC1), ou rôle de patrouilleur (β 2-integrin)	Pro athérogène.
VCAM-1	α 4-integrin	Adhésion à l'endothélium inflammé	Pro athérogène.
PECAM1 endothéliale	PECAM1	Migration trans-endothéliale	-

I. Macrophages

i. Généralités

Le système mononucléaire phagocytaire est constitué de cellules provenant d'une lignée commune, dont la fonction première est la phagocytose. Les monocytes et les macrophages tissulaires occupent une place majeure dans ce système car ces cellules ont une morphologie très similaire, une origine commune et des fonctions communes dont la phagocytose. Lorsque le monocyte rejoint un tissu extravasculaire, il entreprend une transformation en une cellule phagocytaire plus grande : le macrophage. Les macrophages ont la capacité d'être activés, processus qui entraîne une augmentation de la taille de la cellule, une production accrue d'enzymes lysosomales, une activité métabolique accrue, et une plus grande capacité phagocytaire pour tuer les microbes ingérés. Les macrophages peuvent démontrer différentes morphologies et propriétés fonctionnelles après activation par des stimuli externes. Les macrophages se répartissent dans tous les organes et tissus de connexions, et sont nommés en fonction de leur localisation, comme les cellules microgliales, dans le système nerveux central, les cellules de Kupffer dans le foie, les macrophages alvéolaires dans les poumons, et les ostéoclastes dans les os.

ii. Origines des macrophages dans la plaque d'athérosclérose

Les macrophages sont les cellules immunitaires les plus abondantes dans la plaque d'athérosclérose. Comme nous avons vu précédemment, le recrutement monocytaire est une étape essentielle pour la formation de l'athérosclérose, et le nombre de monocytes circulants est directement corrélé avec le nombre de macrophages au sein de la plaque (Potteaux et al. 2007). Les travaux de Swirski et son équipe (Swirski et al. 2006) ont longtemps amené à penser que les macrophages M1 au sein des plaques étaient originaires de monocytes Ly6C^{high} et les macrophages M2 des monocytes Ly6C^{low}. Des travaux récents ont cependant mis en avant que, dans certaines conditions, une prolifération locale de macrophages résidents peut conduire à l'accumulation de macrophages au sein des plaques (Schulz et al. 2012; Robbins et al. 2013). La prolifération locale de macrophages semble même être un acteur majeur, puisque dans certains travaux, elle serait à l'origine de 87% des macrophages accumulés (Robbins et al. 2013; Guo et al. 2005). Cependant il convient d'être prudent, car les cellules musculaires lisses présentes dans les plaques expriment des marqueurs macrophagiques, les rendant difficilement distinguables des macrophages (Feil et al. 2014; Shankman et al. 2015).

iii. Prolifération dans la plaque

Les monocytes ayant migré dans l'espace endothélial se différencient en macrophages qui phagocytent les LDL oxydés et forment des cellules spumeuses chargées en lipides (Simionescu 2007). Durant la progression de l'athérosclérose, l'émigration de macrophages hors de la plaque d'athérome est réduite (Fischer et al. 2013) à cause de l'expression accrue de molécules inhibitrices de l'émigration telles que Netrin-1 et Sémaphorine 3E par les cellules spumeuses (van Gils et al. 2012; Wanschel et al. 2013).

Les monocytes lorsqu'ils sont exposés à un certain type de microenvironnement se différencient en différente variété de macrophages. La diversité phénotypique des macrophages peut s'apprécier par l'expression de différents marqueurs de surface mais aussi par leurs sécrétions de molécules caractéristiques. On peut ainsi classer les macrophages en deux principales catégories : les macrophages « classiquement » activés appelés aussi macrophages M1 (Colin, Chinetti-Gbaguidi, et Staels 2014) et les macrophages « alternativement » activés M2 (Stein et al. 1992). Une fois dans les lésions, les macrophages participent activement dans l'inflammation vasculaire par leur sécrétion en cytokines pro-inflammatoires, également accompagnés par la production de chimiokines pour faciliter le recrutement de nouvelles cellules immunitaires. Les plaques d'athérosclérose expriment de nombreuses cytokines pro-inflammatoires pro-athérogènes tel que $TNF\alpha$, IL-18, et IL-12 (T.-S. Lee et al. 1999; Ohta et al. 2005a; Mallat et al. 2001; Whitman, Ravisankar, et Daugherty 2002b). Les caractéristiques des macrophages intra plaques sont représentées dans la figure ci-dessous (Figure 22).

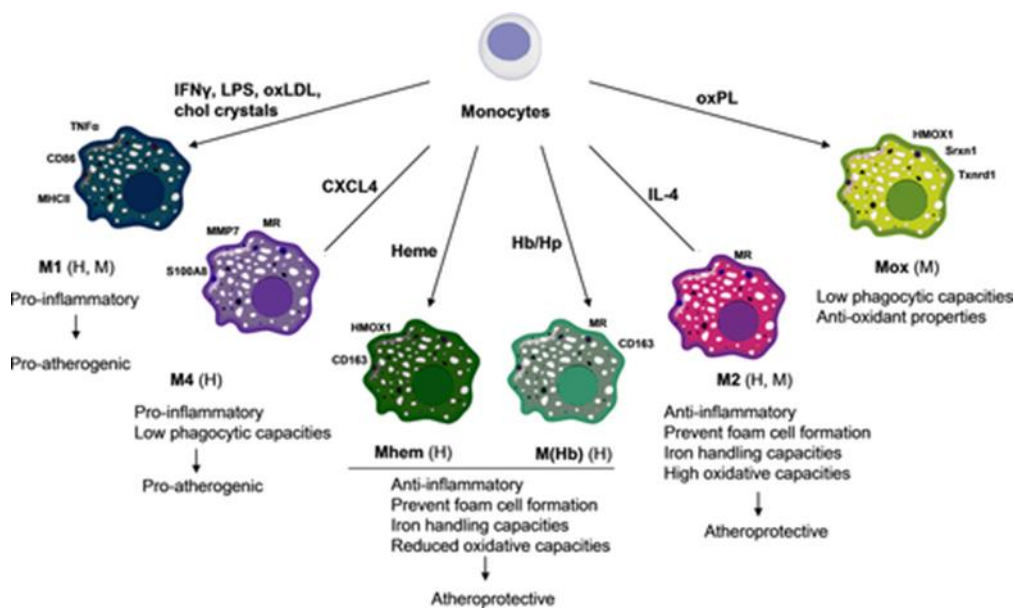


Figure 22 Sous-populations de macrophages et action dans la plaque d'athérosclérose (Colin, Chinetti-Gbaguidi, et Staels 2014).

iv. Plasticité et polarisation des macrophages

Bien que seuls les macrophages M1 et M2 ont été décrits *in vitro*, il faut être conscient que de nombreux macrophages avec une variété de phénotypes différents ont été identifiés sur des modèles *in vivo*. Les stimuli environnementaux vont fortement influencer le phénotype des macrophages dans les lésions d'athérosclérose. Aussi le phénotype du macrophage est évidemment un indicateur dans le rôle que tiendra le macrophage au sein de la plaque. Les macrophages M1 sont traditionnellement associés avec des plaques symptomatiques et instables, tandis que les macrophages M2 sont plus nombreux dans les zones stables avec des lésions asymptomatiques.

Macrophages classiquement activés M1

La voie classique d'activation des macrophages est une réponse aux sécrétions de lymphocytes T-helper 1 activés tel que l'INF γ . Des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , INF γ , et les produits microbiens comme les LPS conduisent seuls ou en association l'activation par la voie classique. Ainsi, les macrophages M1 contribuent à la hausse et au maintien d'une réponse inflammatoire par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, IL-23. Les macrophages M1 produisent également des agents toxiques comme l'oxyde nitrique et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) leur permettant d'éradiquer les infections bactériennes, fongiques ou virales.

Macrophages alternativement activés M2

A l'opposé des macrophages M1 vue précédemment, les macrophages alternativement activés M2 sont considérés comme étant des macrophages anti-inflammatoires. Ils peuvent neutraliser dans l'espace et dans le temps la réponse inflammatoire engendré par les macrophages M1. Les macrophages M2 sont principalement impliqués dans la réparation tissulaire, ils disposent de capacités phagocytaires, pro-angiogéniques et pro-fibrotiques (Jetten et al. 2014; Sierra-Filardi et al. 2010). Des expériences *in vitro* ont permis de diversifier la classification des macrophages M2 avec une subdivision en 4 sous-groupes : M2a, M2c, M2b, et M2d.

Les **macrophages M2a** sont activés en réponse à IL-4 et IL-13, ils expriment à des niveaux élevés le récepteur au mannose CD206 sécrètent des facteurs pro-fibrotiques tels que la fibronectine, le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) et le facteur de croissance transformant β (TGF β) contribuant à la réparation des tissus (Delavary et al. 2011; Jetten et al. 2014). Ils peuvent être considérés comme des « macrophages guérisseurs » (Mosser et Edwards 2008).

Les **macrophages M2b** sont induits par une exposition combinée à des complexes immuns et à des ligands du récepteur Toll-like (TLR) ou à des agonistes du récepteur IL-1 (Mosser et Edwards 2008).

Les **macrophages M2c** sont stimulés par IL-10 ainsi que par les glucocorticoïdes. Tout comme les macrophages M2, ils sont dit « régulateurs » (Mosser et Edwards 2008). Ils présentent de hauts niveaux d'expression en tyrosine kinase leur conférant des capacités pour l'efferocytose (Zizzo et al. 2012; Zizzo et Cohen 2013). Bien que les macrophages M2 soient considérés comme anti-inflammatoires de par leur sécrétion élevé d'IL-10 et leur faible sécrétion d' IL-12, les macrophages M2b ont la particularité de produire simultanément des cytokines pro-inflammatoires (IL-1b, IL-6 et TNF α), de l'IL-10 et d'une expression faible de d'IL-12 (Mosser 2003).

Finalement, les **macrophages M2d** sont stimulés par une costimulation de Toll-Like receptor (TLR) et le récepteur de l'Adénosine A_{2A}. Ces macrophages sécrètent de fortes quantités d'IL-12 et de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de faibles quantités de TNF et d'IL-12. Néanmoins ce sous-type de macrophages n'exprime pas fortement CD206.

Ces caractéristiques sont cependant à relativiser car des marqueurs différents sont utilisés pour distinguer les macrophages M1 et M2 selon un contexte *in vivo* ou *in vitro*. Aussi, bien que les propriétés des macrophages soient conservées entre différentes espèces, certains marqueurs sont spécifiques de l'espèce étudiée. Par exemple, l'expression d'arginase-1 est spécifique des macrophages M2 de souris (Martinez et al., s. d.). Néanmoins, il semble possible d'appliquer, jusqu'à une certaine limite, la classification phénotypique des macrophages *in vitro* au phénotype des macrophages présents dans les plaques d'athérosclérose (Bouhlef, Derudas, et Rigamonti, s. d.). Les caractéristiques des différents types de macrophages sont ainsi résumées (Tableau 7).

Tableau 7 Résumé des principaux sous-types de macrophages décrits *in vitro*, les principaux inducteurs de la polarisation et leurs caractéristiques (MAR : Récepteur au Mannose avec du collagène.) (Colin, Chinetti-Gbaguidi, et Staels 2014).

Macrophage (phénotype)	Inducteurs	Marqueurs et molécules de surface	Production en cytokine et chimiokines	Régulateurs	Fonction dans l'athérosclérose
M1	INF γ , LPS, TNF	IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, MCHII, CD86, CD80	IL-6, TNF α , IL-23, iNOS	STAT1, NF- κ B	Microbicide, Résistance aux tumeurs
M2a	IL-4, IL-13	MR, MCHII, ArgI	IL-10, TGF β , IL-Ra, CCL17, CCL22, CCL1B	STAT6, NF- κ B, IRF4, PPAR γ	Réparation tissulaire
M2b		MCHII, CD86	IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10 ^{élevé} II12 ^{faible}		Immunorégulation
M2c	IL-10, Glucocorticoïdes, TGF β	MR, CD163	IL-10, TGF β	STAT3	Capacité d'efferocytose
M2d	TNF α	TNF α ^{faible} -, II12 ^{faible} , VEGF	IL-10 ^{élevé} , VEGF, TNF α ^{faible} IL-12 ^{faible}	NF- κ B	Pro-tumoral, capacité pro-angiogénique

v. Internalisation des LDL et formation des cellules spumeuses

Le stress oxydatif dans la paroi artérielle favorise la modification de conformation de LDL, ce qui entraîne des signaux de dommages qui sont détectés par les PRR des cellules du système immunitaire inné. Une variété de mécanismes contrôlés pas des enzymes et par des radicaux libres (H_2O_2 , O_2^- , NO) ont été identifiés comme promoteur de l'oxydation des LDL dans l'intima artérielle (Miller et al. 2011). De telles particules sont fortement phagocytées par les macrophages (Kunjathoor et al. 2002; Podrez et al. 1999). Les récepteurs scavengers sont un type de récepteur PRR exprimé par les macrophages ayant un rôle très important dans l'athérosclérose car ils reconnaissent et prennent en charge les LDL oxydés. Dans cette famille de récepteurs, nous pouvons notamment citer : le récepteur scavenger A1 (SR-A1, codé par MSR-1), le récepteur macrophagique avec des structures en collagène (SR-A2), le CD36, le récepteur scavengers B1 (SR-B1), le récepteur similaire à la leptine des LDL oxydés (LOX-1), le récepteur scavengers exprimé par les cellules endothéliales 1 (SREC1) et le récepteur scavenger aux phosphatidylsérines et LDL oxydés (CXCL16). Ces récepteurs peuvent lier les LDL oxydés et entraîner la formation de cellules spumeuses (Maxfield et Tabas 2005). CD36 et SR-A1 sont responsables de la dégradation de 75 à 90% des LDL oxydés *in vitro* (Kunjathoor et al. 2002). Ces récepteurs internalisent les lipoprotéines, puis les esters de cholesteryls des lipoprotéines sont hydrolysés dans le compartiment endolysosomal libérant le cholestérol libre et les acides gras. Le cholestérol libre dans l'endolysosome est ensuite dirigé vers le reticulum endoplasmique où il subit une ré-esterification par l'acétyl coenzyme-A, ce qui produit des esters d'acide gras. Ce sont ces esters qui donnent un aspect « spumeux » aux cellules spumeuses (Maxfield et Tabas 2005). Une illustration du captage des LDL par les récepteurs scavengers et la formation des cellules spumeuses est présentée ci-dessous (Figure 23).

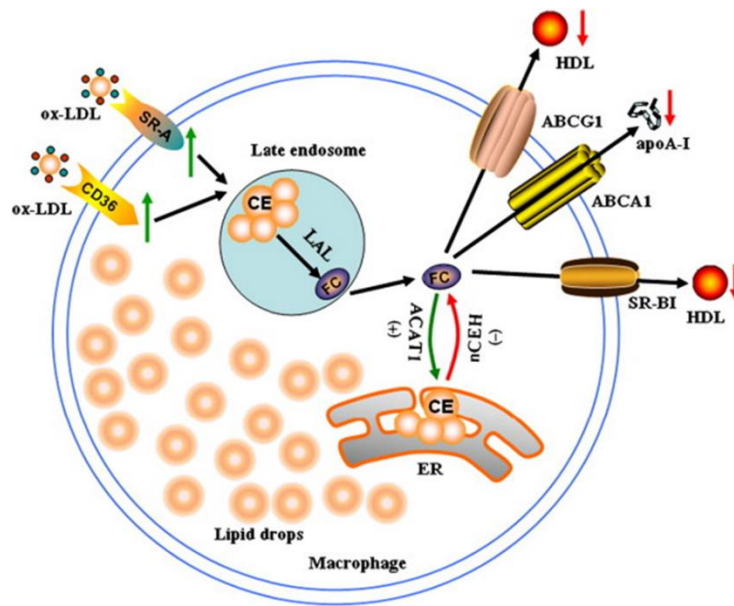


Figure 23 Mécanismes impliqués dans la formation des cellules spumeuses. L'internalisation accrue des LDL et l'estérification du cholestérol conduisent à une accumulation excessive d'esters de cholestérol sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme (Yu et al. 2013).

Il a été observé chez des modèles murins, déficients en apolipoprotéine E, en CD-36 et en SR-A1 (souris ApoE^(-/-), CD36^(-/-), MSR-1^(-/-)) une réduction de l'inflammation, d'apoptose de macrophages et de nécroses. Cela suggère que ces récepteurs n'ont pas uniquement un simple rôle de captage de lipides (Kuchibhotla et al. 2008; Manning-Tobin et al. 2009). La présence de multiples protéases et lipases dans l'intima peut également entraîner une modification des LDL, en effet, la matrice extracellulaire retient les LDL en son sein et module l'activité de nombreuses enzymes lipolytiques telle que la phospholipase A-II. Ces enzymes produisent des formes modifiées de LDL qui ne sont pas pris en charge par les récepteurs scavenger (Boyanovsky, van der Westhuyzen, et Webb 2005).

vi. Enclenchement de la réaction immunitaire

Les macrophages adaptent leur phénotype selon le microenvironnement de la plaque très riche en lipides et en lipoprotéines modifiés par oxydation. Les plaques d'athérosclérose contiennent des cristaux de cholestérols à la fois dans les espaces extracellulaires, et en intracellulaire dans les macrophages résidents. Dans les lésions d'athérosclérose non avancées, il est possible de retrouver des cristaux de cholestérol dès les premiers stades de lésions de l'athérosclérose, avec l'apparition de cellules immunitaires au sein de l'espace sous-endothélial (Lim et al. 2011). Il a aussi été démontré que l'internalisation des cristaux de cholestérol par les macrophages entraînait l'induction de la voie de **l'Inflammasome NLRP3** (Düwell et al. 2010). En effet, cette internalisation déclenche une déstabilisation lysosomale ainsi qu'une libération de protéases et d'Espèces Réactives de l'Oxygène au sein du cytosol activant la voie du NLRP3² ce qui conduit à la sécrétion d'IL-1 β (Düwell et al. 2010; Freigang et al. 2011; Hornung et al. 2008; Usui et al. 2012; Gage et al. 2012). De plus les LDL modifiés peuvent aussi se lier aux TLR, enclenchant une cascade de signaux intracellulaires favorisant la voie du

² NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NFκB et l'expression de gènes de molécules pro-inflammatoires comme les cytokines, chimiokines, eicosanoïdes, des protéases. Cette voie est décrite dans la figure ci-dessous (Figure 24).

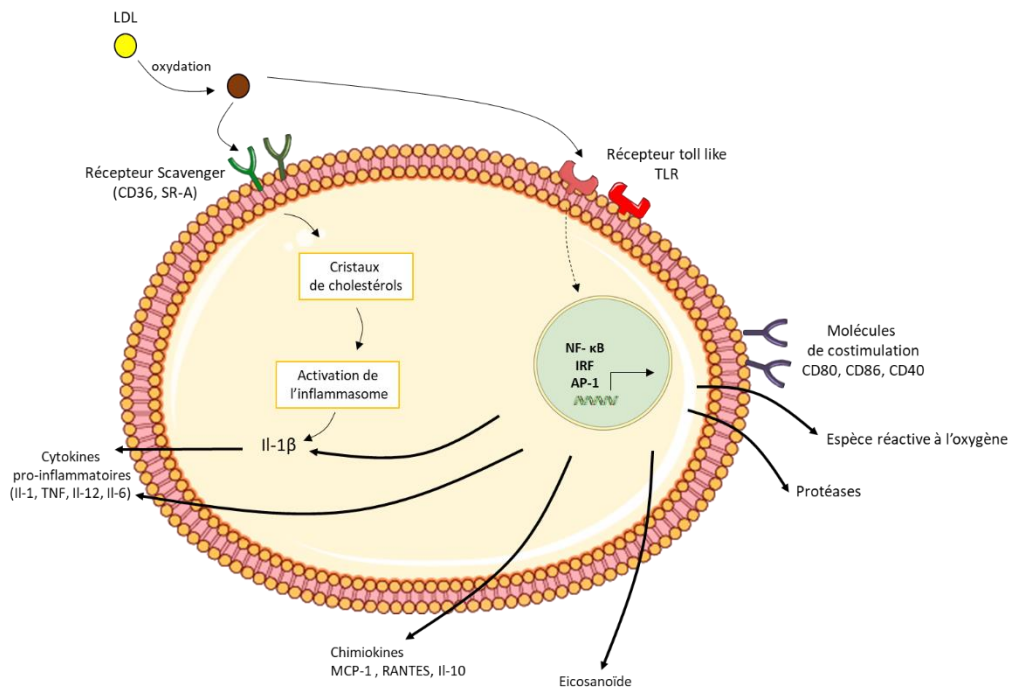


Figure 24 Activation de la réponse immunitaire innée par la voie de l'inflammasome NLRP3 par des lipoprotéines (Göran K. Hansson et Hermansson 2011).

Les macrophages M2 accumulent fortement les LDL, ce qui conduit à la libération de cytokines pro-inflammatoires telle que IL-6, IL-18 et MCP-1 par un mécanisme dépendant du facteur de transcription de type 2 de Krüppel (KLF2), ce qui conduit à une polarisation vers le phénotype M1 (Tits et al. 2011; Hirose et al. 2011). Le tableau ci-dessous résume les différents types de cholestérol et leur influence sur la polarisation.

Tableau 8 Influence du type de cholestérol dans la polarisation des macrophages.

Type des cholestérols	Type de polarisation
LDL oxydé	Macrophages M1
Cristaux de cholestérols	
Cholestérylesters oxydés	
LDL minimalement modifiées	
Cholesteryllinoléate	
7-cétocholestéryl-9-carboxinonanoate	
9-oxononanoate de cholestéryle	
L'acide docosahexaénoïque	Macrophages M2
Sphingosine-1-phosphate	
Acide linoléique	

vii. Rôle dans la stabilité de la plaque d'athérosclérose

Au cours du développement de la pathologie athéromateuse, il y a une augmentation de la quantité totale de macrophages et de la présence de cytokines pro-inflammatoires au sein de la plaque. Ce phénomène s'associe avec une croissance de l'instabilité de la plaque. Cependant la répartition des macrophages n'est pas homogène selon les différentes zones de la plaque. En effet, des analyses histologiques ont déterminé des zones de distribution spatiale avec vulnérabilité accrue où la plaque est la plus susceptible de se rompre. Dans ces zones de vulnérabilité, les macrophages M1 constituent la population principale, tandis que dans les régions plus stables de la calotte fibreuse la répartition en macrophages M1/M2 est similaire. Les macrophages M2 constituent la majorité de la population dans l'adventice de la plaque d'athérosclérose humaine. Des études portant sur la distribution du phénotype de macrophages dans des plaques carotidiennes sur des patients symptomatiques, c'est-à-dire souffrant d'un accident ischémique aigu, par rapport à des patients asymptomatiques ont révélé une surreprésentation des macrophages M1 dans les plaques symptomatiques instables (Cho et al. 2013). Les macrophages sont à l'inverse en plus grande proportion dans les plaques stables asymptomatiques (Cho et al. 2013). De la même façon, des analyses immunohistochimiques sur des plaques carotidiennes de patients ayant subi un infarctus du myocarde suite à une rupture de plaque ont montré une plus forte intensité des zones immuno-positives CD11c, reflétant le phénotype M1, par rapport à des plaques carotidiennes stables (C. W. Lee et al. 2013).

Ces éléments sont des indices laissant penser que la vulnérabilité de la plaque est davantage liée au phénotype des macrophages qu'au nombre brut de macrophages présents dans la plaque. Ainsi le phénotype macrophagique peut être considéré comme un marqueur de stabilité de la plaque.

viii. Facteurs de transcription

Signalisation STAT

La balance entre l'activation de la voie JAK-STAT³ et d'activation de NF-κB apparaît comme une marque de l'activation M1 dans les plaques d'athérosclérose humaine (Brand et al. 1996). L'activation de NF-κB par des ligands de type TLR produit des facteurs pro-inflammatoires (Bonizzi et Karin 2004). En revanche, l'activation des homodimères p50 de NF-κB semble être importante pour la polarisation M2 des macrophages humains et murins (Porta et al. 2009). Par ailleurs, les souris greffées avec de la moelle osseuse déficiente en sous-unité p50 présentent des lésions inflammatoires plus petites que les souris sauvages, cette diminution est liée à une formation réduite de cellules spumeuses (Kanters et al. 2004). Le rôle de NF-κB dans les macrophages humains n'est cependant pas encore bien établi, mais il convient de constater les différences qualitatives dans l'activation des différentes sous-unités du NF-κB qui peuvent enclencher des effets opposés par rapport à l'acquisition des phénotypes de macrophages de type M1 et M2.

Facteur de régulation de l'interféron (IRF).

Les facteurs de régulation de l'interféron IRF sont une famille de facteurs de transcription exprimés par les macrophages et qui vont influencer leur polarisation vers différents phénotypes. Par exemple, IRF5 est stimulé par des stimuli pro-inflammatoires et va réguler à la hausse des gènes pro-inflammatoires et à la baisse des gènes avec un rôle anti-inflammatoires « pro-M2 ». C'est donc un médiateur de la polarisation M1 des macrophages humains et murins (Krausgruber et al. 2011). IRF4 quant à lui est un modulateur de la réponse alternative des macrophages M2 dans le modèle murin (Satoh et al. 2010).

Le signal CREB et C/EBP

Les facteurs de transcription de type C/EBP⁴ ainsi que la protéine de liaison à l'AMPc jouent un rôle dans l'activation des macrophages (Ruffell et al. 2009). C/EBPα et C/EBPβ sont fortement exprimés au sein des progéniteurs myéloïdes (Friedman 2007), C/EBPβ est un modulateur de la polarisation macrophagique. En effet, l'expression de Arg-1 conduisant à la polarisation M2 est dépendante d'un stimulus tel que les TLR et son induction est médiée par C/EBPβ dans le modèle murin. Il est de plus suggéré que la cascade C/EBPβ/CREB est nécessaire à la polarisation des macrophages, car le blocage de cette cascade empêche la régulation à la hausse de gènes associés à voie M2 (Arg1, IL-10, CD206) (Ruffell et al. 2009). C/EBPα est également essentiel dans la polarisation du phénotype des macrophages M1 et M2 chez la souris ; son inhibition entraîne une altération de la polarisation M1 via le LPS et M2 via l'IL-4 (B. Lee et al. 2014). Enfin il convient de citer le facteur de KLF4, membre de la famille des facteurs de transcription en doigt de zinc, il induit l'expression de marqueurs pro-M2 (Arg1, Fizz1 et PPARγ) par la signalisation STAT-6 et inhibe la polarisation M1 en séquestrant les cofacteurs NF-κB dans les modèles murins (Liao et al. 2011). A l'opposé, l'expression de KLF2 est stimulée à la hausse par une stimulation par l'IL-4 dans les

³ Janus kinases signal transducer and activator of transcription proteins

⁴ CCAAT-box/Enhancer Binding Protein

macrophages dérivés de moelles osseuses (BMDM) (Lingrel et al. 2012) et KLF2 inhibe l'expression de gènes pro-M1 dans les monocytes et macrophages (Mahabeleshwar et al. 2011; Das et al. 2006).

J. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigènes, qui peuvent présenter une grande variété d'antigènes aux cellules T. De plus elles initient et soutiennent la réponse immunitaire tout en régulant l'activité des cellules T. Leur rôle activateur ou inhibiteur des lymphocytes est hautement dépendant de leur production en cytokines et de la présence de molécules de co-stimulation. L'activation de récepteurs des CD (par exemple les TLR) leur confèrent la capacité d'être présentateur d'antigène et ainsi d'activer les cellules T effectrices. Ces cellules jouent le rôle très important de connecteur entre le système immunitaire inné et adaptatif (Wigren, Nilsson, et Kolbus 2012). Les CD sont à l'origine des monocytes. La capacité à présenter l'antigène provient de CD qui sont d'origines monocytaires (Legein et al. 2013). Enfin elles sont capables de générer à la fois des cytokines pro-inflammatoires comme TNF α , IL-6 ou IL-12, mais également des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10.

Le marqueur distinguant les CD chez la souris est l'expression de CD11c. Ceci a permis d'identifier des zones de présence de ces cellules dans les artères, c'est-à-dire préférentiellement dans l'adventice des (Moos et al. 2005). Cependant lors de l'athérosclérose, la présence de CD est accrue dans l'intima des artères (Jongstra-Bilen et al. 2006).

La présence de CD dans les plaques d'athérome est associée avec une hausse de l'expression de molécule d'adhésion VCAM-1, et l'interaction entre CD et lymphocytes T est accru dans les plaques proches de la rupture (Yilmaz et al. 2004). Les cellules dendritiques expriment également les récepteurs scavengers, facilitant l'internalisation de LDL oxydés stimulant la voie du NF κ B conduisant à une action pro inflammatoire par sécrétion cytokinique de la cellules dendritique (Goossens et al. 2010). Lorsque que les CD sont activées par les LDL oxydés, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires et initient la prolifération de cellules T.

K. Interaction entre système immunitaire et adaptatif

Les cellules présentatrices d'antigènes (APC) sont essentielles au système immunitaire adaptatif, car elles peuvent englober et traiter les peptides antigéniques et les présentent, en association avec les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) à la surface cellulaire pour être reconnues par les cellules T. Le rôle présentateur d'antigène des cellules dendritiques permet l'activation de lymphocytes T naïfs. Les CD, les macrophages et les cellules B fonctionnent tous comme APC pour les cellules T effectrices et les cellules T mémoires qui proviennent de la différenciation de cellules T naïves activées. Les CD peuplent la plupart des tissus de l'organisme dans lesquels ils agissent comme des sentinelles d'identification des pathogènes grâce à leur riche répertoire de PRR, à leurs longues dendrites et à leur robuste activité phagocytaire et endocytaire. Après une stimulation immunitaire innée, les CD migrent vers les tissus lymphatiques, où ils peuvent interagir avec les cellules T naïves en recirculation. Ainsi, les CD rencontrent des antigènes provenant des parois artérielles et sont impliquées dans l'activation des cellules T spécifiques de ces antigènes. Les CD présents dans les lésions d'athérosclérose absorbent le cholestérol et les lipoprotéines contenant du cholestérol, et ainsi, ces cellules chargées en lipides restent

capables de présenter un antigène (Packard et al. 2008). Ceci témoigne d'une imbrication du système immunitaire innée et adaptatif et de leur rôle complémentaire.

3. Système immunitaire adaptatif

Contrairement aux mécanismes innés de défense, le système immunitaire adaptatif repose sur sa spécificité à un antigène cible. Les réponses adaptatives sont principalement basées sur les récepteurs spécifiques des antigènes exprimés à la surface des lymphocytes T et B. Les récepteurs spécifiques à l'antigène de la réponse adaptative sont codés par des gènes qui subissent des réarrangements somatiques de la lignée germinale pour former des gènes codants pour les récepteurs des cellules T (TCR) et d'immunoglobuline (récepteur d'antigène de cellule B). L'assemblage des récepteurs d'antigènes à partir d'une collection de quelques centaines de gènes codés dans la lignée germinale permet la formation de millions de récepteurs d'antigènes différents, chacun ayant une spécificité unique pour un antigène. Enfin, bien que différent, les réponses innées et adaptatives opèrent en synergie ce qui permet une réponse immunitaire bien plus efficace.

A. Présentation de l'antigène et le complexe majeur d'histocompatibilité

Le complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH est un système de reconnaissance du soi présent à la surface des cellules. Le CMH de classe I est présent à la surface de la majorité de cellules nucléées, tandis que le CMH de classe II n'est présent que sur les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules B. Lorsque l'antigène est produit de manière endogène (comme une protéine virale ou cancéreuse) il se retrouve complexé par le CMH de classe I. Le CMH de classe II va quant à lui prendre en charge les particules exogènes qui lui auront été présentés par les cellules présentatrices d'antigènes.

i. Complexe majeur d'histocompatibilité I

Lors de la présence d'un antigène au sein d'une cellule, les peptides antigéniques vont être libérés dans le cytoplasme cellulaire et transportés vers le réticulum endoplasmique et pris en charge par les molécules du CMH I. Une fois la liaison de l'antigène au CMH I réalisée, l'ensemble va être dirigé vers la membrane cellulaire via l'appareil de Golgi. Le CMH alors situé au niveau extracellulaire sera en mesure de présenter l'antigène. Les antigènes reconnus par CMH I activent les cellules T CD8⁺ cytotoxiques qui, dans la majorité des cas tuent les cellules hôtes (Figure 25).

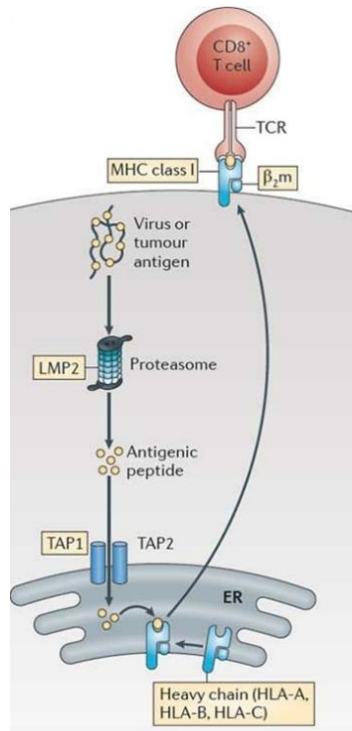


Figure 25 Protéine intracellulaire (d'origine virale par exemple) prise en charge par le CMH-I puis exposée à la surface cellulaire pour présentation aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (Kobayashi et Van Den Elsen 2012).

ii. Complexe majeur d'histocompatibilité II

Lorsque les antigènes dérivent de pathogènes extracellulaires ils sont phagocytés par les cellules du système phagocytaire. La protéine antigénique est donc internalisée et dégradée par l'acidité de l'endosome, des molécules du CMH II sont ensuite exportées par des vésicules vers la particule endosomale afin d'établir une liaison entre l'antigène et le CMH. Les peptides antigéniques sont ensuite présentés à la surface de la cellule par le CMH II et pris en charge par les cellules T CD4+ (Figure 26).

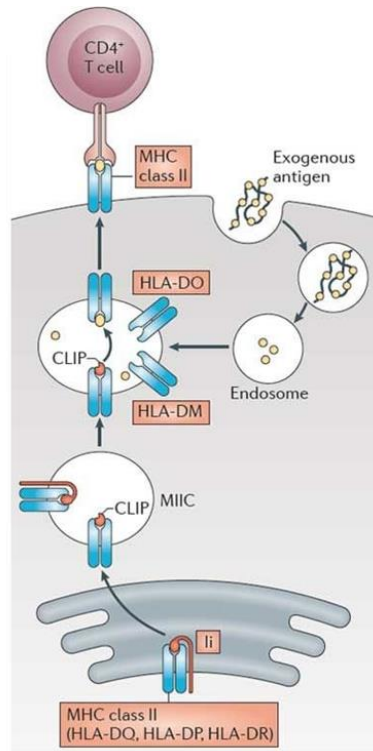


Figure 26 Internalisation d'un antigène extracellulaire suivie d'une prise en charge par le CMH-II et exposition à la surface pour présentation aux lymphocytes T CD4+ (Kobayashi et Van Den Elsen 2012).

B. Lymphocytes T

Un des défis du système immunitaire est sa capacité à distinguer le « soi » du « non-soi » tout en étant capable de reconnaître une large gamme de corps étrangers ou antigènes. Les lymphocytes T sont en mesure de construire une réaction immunitaire qualifiée de spécifique car ils disposent à leur surface de récepteurs d'antigènes qui facilitent la reconnaissance de matières étrangères dans l'organisme. Cependant contrairement à une réponse innée qui est rapide, cette réponse est plus lente car elle nécessite la mise en place de différentes étapes intermédiaires entre le moment de la survenue du pathogène, et la mise en place d'une réaction de défense. Le lymphocyte T est le maître de l'immunité par médiation cellulaire, cette tâche est accomplie par contact cellulaire ou direct ou par l'intermédiaire de cytokines.

i. Le récepteur des cellules T

Le récepteur des cellules T (TCR) est une protéine transmembranaire composée de 2 chaînes polypeptidiques et chaque lymphocyte porte un TCR qui possède une unique spécificité. Les lymphocytes T peuvent être stimulés par un antigène et ainsi donner naissance à des progénitures bénéficiant d'une spécificité antigénique unique. Le TCR est toujours exprimé avec un complexe CD3 contenant de nombreuses sous-unités indépendantes, qui sont requises pour la transduction du signal lors d'un contact avec un antigène. Ce récepteur est représenté ci-dessous (Figure 27).

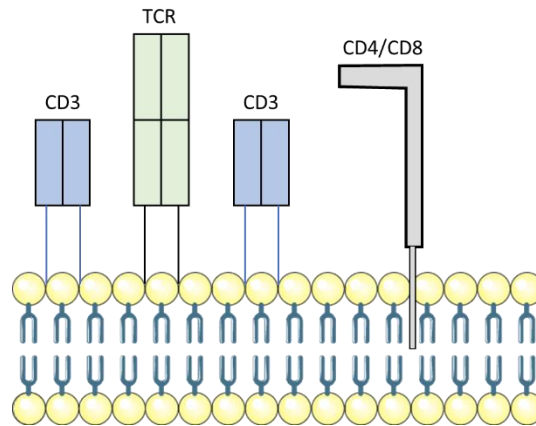


Figure 27 Structure du complexe TCR.

L'interaction du complexe TCR/CD3 avec le peptide antigénique présenté dans une molécule de CMH ne fournit qu'un signal partiel pour l'activation cellulaire. L'activation complète nécessite la participation supplémentaire d'une molécule de co-stimulation, telle que CD28 pour les cellules T et CD80 ou CD86 pour les cellules présentatrices d'antigènes (Nurieva, Liu, et Dong 2009). Les portions cytoplasmiques de chacune des chaînes CD3 contiennent des protéines dont l'activation conduit à l'activation de gènes qui contrôlent la prolifération et la différenciation des lymphocytes. Inversement, une des voies d'inactivation est médiée par la molécule de surface CD45.

ii. Le développement des cellules T

Toutes les cellules de la lignée lymphocytaire ont pour origine un progéniteur lymphoïde commun, différencié à partir de cellules souches hématopoïétiques. Les précurseurs de cellules T migrent dans le thymus où ils subissent une sélection thymique afin d'éliminer les cellules auto-réactives. Les stades de développement des cellules T correspondent à des réarrangements de gènes leur conférant leurs spécificités en matière de TCR. Le thymus joue un rôle central dans la maturation des lignées de cellules T. Une des conditions permettant aux lymphocytes en formation de passer le processus de sélection est la possession d'un TCR fonctionnel. Et c'est au cours de ces réarrangements géniques que le complexe CD3 est exprimé.

iii. Sous-types de lymphocytes T

Au cours de leur progression dans le thymus, les cellules T se différencient en sous-populations discrètes, chacune ayant un répertoire défini de fonctions effectrices. Les principaux sous-ensembles sont définis par leur expression superficielle sélective de CD4 ou CD8. Dans le thymus, la plupart des cellules T en développement suivent un programme de développement dans lequel, dans le cortex, elles n'expriment d'abord ni CD4 ni CD8 (double négatif), puis elles expriment à la fois CD4 et CD8 (double positif) (von Boehmer et al. 1989). Les cellules doublement positives sont testées par sélection positive dans le cortex thymique, et celles qui sont sélectionnées sur les molécules du CMH de classe I deviennent CD4-CD8+ et celles qui sont sélectionnées sur les molécules du CMH de classe II deviennent CD4+CD8-.

Lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ sont des lymphocytes T « helper » portant le marqueur CD4 à leur surface. Ces cellules sont orchestratrices de la réponse immunitaire, par leur capacité de reconnaissance de l'antigène et leur capacité d'activation de la réponse immunitaire innée pour faciliter l'éradication d'un pathogène. Ils jouent également un rôle très important dans l'activation des cellules B. Les cellules T CD4+ reconnaissent des épitopes antigéniques présentés par le CMH II. Lorsqu'activées par les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules T CD4 prolifèrent et se différencient en différentes sous-unités catégorisées selon les cytokines qu'elles produisent et disposant de différentes fonctionnalités (Swain et al. 1991).

Les cellules T-helper 1 (T_H1)

Ce sont des cellules CD4+ effectrices qui se différencient sous l'influence de l'IL-12. Elles produisent majoritairement de l'INF γ , cytokine favorisant l'activation de macrophages de type M1 et très abondante dans les plaques d'athérome. Les cellules T_H1 ont tendance à amplifier la réponse inflammatoire et d'aggraver l'athérosclérose. Elles entraînent une diminution du taux de fibres de collagène, une hausse de l'expression du CMH II, augmentent la sécrétion en protéases et sécrétions en chimiokines, favorisent l'apparition de molécules d'adhésions et stimulent l'activation de macrophages et de cellules endothéliales (Göran K. Hansson et Hermansson 2011).

Les cellules T-helper 17 (T_H17)

Ces cellules sont sous l'influence de TGF β et d'IL-6, elles produisent de hauts niveaux d'IL-17 et stimulent la réponse des neutrophiles. Tout comme les cellules T_H1, elles sont particulièrement pro-inflammatoires mais leur rôle dans l'athérosclérose est encore sujet à débat. Il a été démontré que l'interleukine 17 est présente dans les plaques d'athérome de façon significative suggérant un rôle pro-athérogénique (Erbel et al. 2009; Smith et al. 2010; Van Es et al. 2009). Par ailleurs l'inhibition de cette interleukine chez des modèles murins entraînait un développement diminué de la pathologie (Soraya Taleb et al. 2009).

Les cellules T-helper 2 (T_H2)

Ce sont des cellules CD4+ effectrices se différenciant en présence d'IL-4, IL-5 et IL-13. Les cellules T_H2 fournissent un appui dans la production d'anticorps, tout particulièrement les IgE, pour cibler les helminthes ou autres parasites. De par ses sécrétions en cytokines, ces cellules ont des propriétés modulatrices de l'inflammation. Leur rôle dans l'athérosclérose n'est pas encore bien établi (Davenport et Tipping 2003; van Wanrooij et al. 2007; Fredrikson et al. 2005; Binder et al. 2004a). En effet, des études contradictoires démontrent des effets pro-athérogènes tandis que d'autres démontraient des effets athéro-protecteurs.

Les cellules T folliculaires-helper (T_{FH})

Ces cellules se différencient en présence d'IL-6 et peuvent sécréter une grande variété de cytokines ce qui induit la stimulation de la production d'anticorps associés à la fois avec une réponse immunitaire de type T_H1 et T_H2.

Les cellules T CD4 régulatrices ou cellules « Treg »

Les cellules Treg naturels (nTreg) sont des modulateurs négatifs des cellules immunitaires effectrices. Elles jouent un rôle clé dans la prévention de l'athérogenèse et présentent plusieurs phénotypes fonctionnels. Ces cellules sont définies comme une population de cellules T uniques qui expriment CD4 et CD25 ainsi que le facteur de transcription Foxp3. Ces cellules mûrissent au sein du thymus et ont des récepteurs de cellules T ayant une forte affinité avec les antigènes du soi et sont capables de réguler les effets proinflammatoires à la baisse par la sécrétion d'IL-10 et de TGF β . Ces cellules sont uniques au sens où elles n'ont pas besoin d'être en contact avec un antigène pour engager des activités immunosuppressives.

Il existe également des cellules iTreg inductibles qui incluent les cellules T régulatrices T_r1 et T_h3, qui dérivent de cellules T effectrices, uniquement après exposition avec un antigène. Elles expriment également CD4 et CD25 mais ne nécessitent d'exprimer Foxp3 pour être fonctionnelles (Ray et al. 2010). Les cellules T_r1 sécrètent IL-10 tandis que T_h3 produisent du TGF β . Les cellules nTreg et iTreg ont toutes deux un rôle non redondant dans le maintien de l'homéostasie immunologique par l'auto-reconnaissance ou la non-reconnaissance. Ils sont capables de prévenir l'auto-immunité en entrant en compétition avec d'autres cellules T pour la formation de CMH-II sur les APC, en augmentant le récepteur inhibiteur CTLA-4, ou en inhibant l'expression de la molécule de costimulation CD80/CD86 et par des effets cytotoxiques et/ou inhibiteurs sur d'autres cellules effectrices.

Des études sur souris ont démontré que, lorsque les fonctions des lymphocytes Treg étaient altérées par des manipulations génétiques, les animaux avaient une athérogenèse accrue, des lésions avec des signes accrus d'inflammation avec parfois des enclenchements de thromboses (Ait-Oufella et al. 2006; Robertson et al. 2003). Il s'agit d'un sous-type de lymphocytes considéré comme ayant des propriétés athéroprotectrices (Ait-Oufella et al. 2006; Entin-Meer, Afek, et George 2009; Mallat et al. 2003; Gotsman Israel et al. 2006; Gotsman Israel, Gupta Rajat, et Lichtman Andrew H. 2007; S. Taleb, Tedgui, et Mallat 2008).

Ainsi, en ce qui concerne les lymphocytes T, la progression de la plaque d'athérome sera fortement influencée par la balance entre cellules Treg et cellules T_H2 anti-inflammatoires et les cellules T_H1 et T_H17 pro-inflammatoires.

Cellules T CD8+

Parmi les cellules T n'exprimant pas CD4 à leur surface nous devons citer les lymphocytes T CD8+. Le rôle principal de ces cellules est d'éliminer les cellules infectées par un pathogène. Dans la plupart des cas, ces cellules ont besoin de cellules T CD4+ pour être activées, en effet cela facilite l'activation de marqueur de costimulation pour optimiser l'activité cytotoxique. Cette cytotoxicité passe en particulier par la production de granules cytotoxiques telles que les perforines ou les granzymes. Ces granules entraînent l'apoptose des cellules cibles par contact cellule-cellule. Les lymphocytes T CD8+ activés produisent également différentes cytokines pro-inflammatoires telles qu'INF γ , TNF α . Ces cellules représentent 1/3 des lymphocytes présents dans les lésions. Ils reconnaissent des antigènes liés aux groupes CMH de nombreux types cellulaires, typiquement les antigènes viraux présents dans les cellules infectées. Cependant plusieurs médiateurs présents dans les lésions peuvent recruter les cellules T CD8

afin de tuer les cellules musculaires lisses et les macrophages impliqués dans l'augmentation de taille et des complication des lésions (Ludewig et al. 2000).

Cellules T natural killer

Les cellules T Natural Killer ou « TNK » sont un groupe de cellules T hétérogènes, qui partagent des caractéristiques des cellules T et des cellules Natural Killer. Ces cellules reconnaissent une molécule présentatrice d'antigène le CD1. Ces cellules ne sont pas retraits aux CMH pour exercer leurs activités. Elles constituent seulement 0,2% du total de cellules T dans la circulation sanguine. Elles sécrètent différentes cytokines, dont $INF\gamma$, IL-4 et IL-10 et tuent directement leur cellule cible. Ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires et sont donc athéro-aggravantes (Tupin et al. 2004). Les effets des lymphocytes sur la plaque d'athérome sont résumés ci-après (Figure 28).

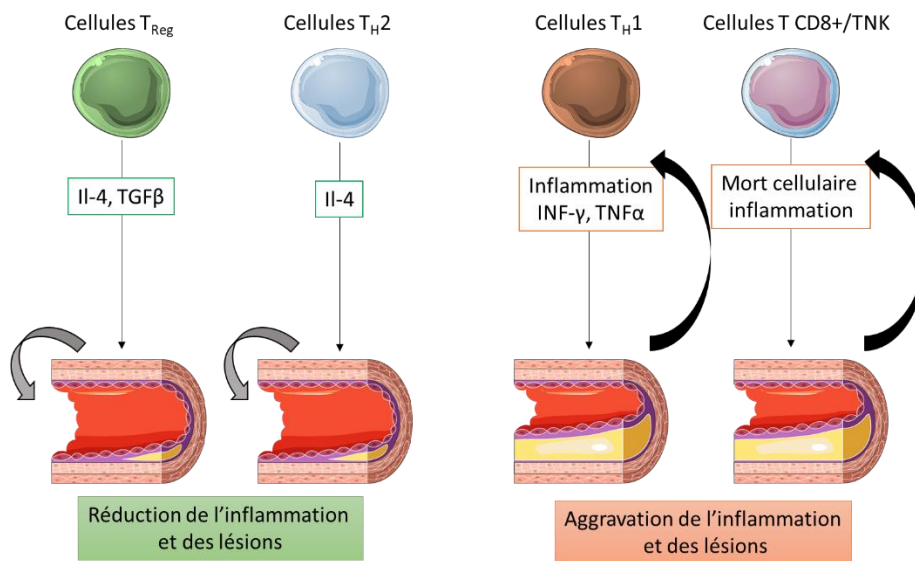


Figure 28 Présentation des différents types de lymphocytes et leurs effets sur la plaque d'athérosclérose.

Action des lymphocytes dans la plaque d'athérosclérose

Les lymphocytes T résident généralement dans l'adventice, des artères normales, non inflammatoires ou endommagées (Galkina et Ley 2007a). Il est suggéré que cette localisation de cellules T est une conséquence de la venue de cellules T dans les parois artérielles, par l'action des sélectines-L. L'athérosclérose (à un stade précoce ou avancé) accélère le recrutement des cellules T auprès de l'artère (Galkina et Ley 2007b). La majorité de ces cellules T sont CD4+ avec un phénotype activé, et une minorité sont CD8+ (Goran K Hansson, Holm, et Jonasson 1989). Des cellules T spécifiques des LDL oxydés sont retrouvées dans les plaques, ce qui suggère une activation et une expansion locale durant l'athérogenèse (Paulsson et al. 2000).

L'athérosclérose est un processus dynamique, et l'inflammation sous-jacente passe par différentes étapes. L'athérosclérose en stade précoce présente une majorité de cellules T CD4+ Th1 avec une production prépondérante d'INF γ , d'IL-6 et d'anticorps IgG2a adressés contre les LDL (Zhou et al. 1998).

Plasticité cellulaire

De façon similaire aux monocytes et macrophages, le phénotype fonctionnel des lymphocytes T peut être changé en réponse au microenvironnement, modifiant ainsi leur capacité à fonctionner comme cellules régulatrices ou inflammatoires. Les cellules T_{reg} peuvent répondre à certains médiateurs proinflammatoires dans des environnements tissulaires locaux et assumer certaines des propriétés phénotypiques des cellules T effectrices (T_{eff}) à des certains endroits bien définis. Ces cellules possédant un phénotype intermédiaires T_{reg}-T_{eff} peuvent tout à fait avoir conservé leurs propriétés immunosuppressives, mais dans certaines conditions, telles les pathologies auto-immunes, les cellules T_{reg}-T_{eff} peuvent assumer un rôle pro inflammatoire similaire aux cellules T effectrices (Sawant et Vignali 2014).

La proportion de cellules T_{reg} diminue au cours du développement de l'athérosclérose contrairement aux cellules T effectrices (Maganto-García et al. 2011), cela pourrait être attribué à la plasticité phénotypique, ainsi qu'aux différences entre ces deux types cellulaires en matière de capacité à migrer dans les lésions. De nombreux indices laissent à penser que dans un contexte inflammatoire d'athérosclérose, les cellules T_{reg} perdent leurs capacités à moduler l'inflammation et deviennent des acteurs proinflammatoires.

Il a été rapporté que l'environnement d'athérosclérose et l'hypercholestérolémie gouvernaient la plasticité phénotypique cellulaire des cellules T, résultant en une perte de fonctions régulatrices et une hausse des paramètres pro inflammatoires. Ainsi il a été observé que les cellules T_{reg}-T_{eff} s'accumulaient dans les lésions d'athérosclérose de souris ApoE^(-/-) et que ces cellules dérivent d'anciennes cellules T_{reg} et non pas de cellules T CD4+ naïves (Butcher et al. 2016). De plus cette conversion de cellules T_{reg} en cellules effectrices ne survient pas chez les souris C57/Bl6 qui ne développent pas d'athérosclérose. Il a aussi été observé que ces cellules T_{reg}-T_{eff} produisaient en abondance INF γ et TNF α , des cytokines hautement inflammatoires (J. Li et al. 2016).

De nombreuses études pointent également le fait que, dans des conditions de maladie auto-immunes ou dans des modèles animaux mimant ces pathologies, les cellules T effectrices sont également soumises à une plasticité et différencient au sein des tissus enflammés vers des profils pro inflammatoires. Des cytokines pro inflammatoires comme IL-1, IL-6 et IL-23 exprimées dans les lésions d'athérosclérose provoquent la conversion de cellules Th17 (majoritairement sécréteur d'IL-17A et d'IL-

10) en un phénotype pathogénique sécréteur d'IL-17A, IL-22 et INF γ (Burkett, zu Horste, et Kuchroo 2015). L'action des lymphocytes T dans la plaque d'athérome est résumée ci-après (Figure 29).

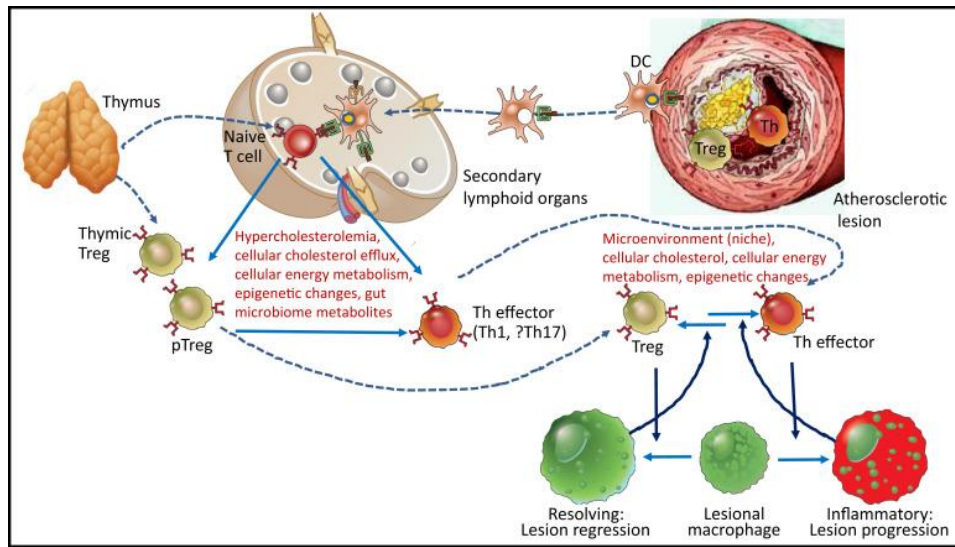


Figure 29 Action du système immunitaire adaptatif par le biais des cellules T dans l'athérosclérose (Tabas et Lichtman 2017).

L'action des cellules T affectant l'athérosclérose va reposer sur une balance entre cellules T effectrices, principalement des cellules Thelper productrices d'INF γ et de cellules anti-inflammatoires T_{reg}. Les cellules effectrices T_{helper} pro-athérogènes se proviennent de cellules T naïves originaire du thymus dans les organes lymphoïdes secondaires, tels que les ganglions lymphatiques, en réponse à la présentation d'antigènes de peptides dérivés de LDL par les cellules dendritiques (DC), dont certains pourraient provenir de la paroi artérielle. Les cellules T_{reg} proviennent soit du thymus, ou se différencient à partir de cellules T naïves périphériques. Les cellules T_{reg} et T_{eff} migrent vers les lésions d'athérosclérose et modulent l'inflammation locale en influençant le phénotype des macrophages. Les macrophages peuvent également influencer l'équilibre entre cellules T effectrices et cellules T_{reg} dans un sens ou un autre.

Influence du cholestérol

Contrairement aux macrophages, les cellules T n'accablent pas de grandes quantités de cholestérol lors d'une hypercholestérolémie. Cependant l'exposition au LDL-oxylé et les perturbations du métabolisme du cholestérol intrinsèque ont des effets profonds sur les fonctions des cellules T et ils sont impliqués dans la modulation phénotypique des cellules T.

Le foie est depuis longtemps reconnu comme un site important pour l'induction de la tolérance des cellules T périphériques. Étant donné le rôle central du foie dans la gestion du cholestérol alimentaire et la synthèse des lipoprotéines, il est intéressant d'examiner comment les cellules T hépatique réagissent aux changements de l'homéostasie du cholestérol. Il est rapporté que l'hypercholestérolémie induite chez des souris Ldlr^(-/-) nourries au régime gras « Western diet » augmente le nombre de cellules T_{reg} dans le foie ainsi que l'expression du TGF- β , qui est une cytokine immunosuppressive (Mailer et al. 2017). Par ailleurs, des expériences de transfert adoptif ont montré que ces cellules T_{reg} hépatiques peuvent se diriger vers les plaques d'athérome. Enfin l'hypercholestérolémie favorise la différenciation des cellules T hépatiques en cellules Th1 ou Th17, selon la présence ou l'absence de récepteurs à LDL. Ces données suggèrent que les changements systémiques du métabolisme des lipoprotéines et du cholestérol alimentaire pourraient modifier le rapport T_{reg}-T_{eff} généré dans le foie, ayant également une influence dans le rapport T_{reg}-T_{eff} dans la plaque d'athérome.

L'influence du cholestérol sur les cellules T peut s'exercer via les cellules dendritiques (CD). Celles-ci sont présentes dans les régions sujettes à l'athérosclérose et peuvent capter les LDL-oxydés (Paulson et al. 2010). Ces cellules conservent leurs fonctions présentatrices d'antigènes même une fois devenues des cellules spumeuses (Packard et al. 2008). Elles sécrètent alors de nombreuses cytokines qui entraînent la différenciation des sous-types de populations de cellules T (Westerterp et al. 2017).

Le cholestérol peut également agir directement sur les cellules. pour exemple il est apparu qu'une délétion du transporteur d'efflux du cholestérol ABCG1 entraînait une augmentation de la différenciation de cellules T_{reg} à partir de cellules T naïves (Armstrong et al. 2010).

C. Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont une catégorie de lymphocytes qui produisent des anticorps, essentiels à la potentialisation du système immunitaire inné. En effet, ces anticorps permettent la neutralisation de toxines, préviennent l'adhérence d'organismes étrangers, activent le système du complément, permettent l'opsonisation de bactérie lors de la phagocytose et identifient les cellules cancéreuses ou infectées pour destruction par les cellules cytotoxiques de manière anticorps-dépendante. Ces cellules constituent environ 15 % des cellules leucocytaires périphériques.

i. Activation

Les lymphocytes B sont peu circulants et la plupart demeurent dans les tissus lymphoïdes. Ils reconnaissent les antigènes libres dans les tissus lymphoïdes. Lorsqu'il y a une infection répétée par le même microorganisme, les cellules B peuvent être activées par les cellules dendritiques folliculaires et des récepteurs du complément, et se lier au complexe immun contenant l'antigène pour ensuite être activées.

ii. Réponse dépendante de cellules T

La reconnaissance d'un antigène par les cellules B est réalisée par l'immunoglobuline de surface IgM. Cette reconnaissance entraîne l'internalisation et la prise en charge par le CMH II. La cellule B présente alors l'antigène auprès de cellules T spécifiques ce qui entraîne la production de cytokines et de facteurs favorisant la division de cellules B et la maturation de cellules sécrétrices d'anticorps. Les cellules T contribuent également au changement d'isotype par rapport à la réponse initiale avec IgM. Le processus d'activation des cellules B survient principalement dans les nœuds lymphatiques où des mutations hypères somatiques ont lieu, permettant la production d'une plus grande diversité d'anticorps. Les anticorps dont l'affinité avec l'antigène sera la plus élevée bénéficieront d'un bonus de prolifération. Une fois que l'IgM bascule vers un autre isotype, certaines des cellules B activées deviennent des cellules mémoires à longue durée de vie. Ces cellules réagissent rapidement à un second stimulus par une production caractéristique d'IgG. Les cellules B activées peuvent quitter le tissu lymphoïde et passer dans la circulation.

iii. Réponse non-dépendante de cellules T

Les cellules B peuvent également réagir à certains antigènes indépendamment des cellules T. Ces antigènes ont des épitopes (principalement de type polysaccharide) qui lient les récepteurs de cellules B et les activent directement afin d'entraîner la sécrétion d'anticorps IgM. Néanmoins cette réponse n'entraîne pas de maturation d'affinité, il n'y a pas de changement d'isotypes ou de génération de mémoires. Cette réponse est donc limitée aux IgM de courte durée et peu spécifique.

iv. Rôle des cellules B dans l'athérosclérose

Il a été observé par différentes expérimentations que les lymphocytes B vont favoriser une régression de l'athérosclérose plutôt qu'une aggravation. En effet des tests de splénectomies, organe pourvoyeur de lymphocytes B, sur des souris prédisposées à l'athérosclérose ont provoqué une aggravation de la pathologie (Caligiuri et al. 2002).

D. Cytokines

i. Généralités

Les cytokines sont des médiateurs protéiques, qui participent à de nombreux processus physiologiques et jouent un rôle clé dans l'inflammation.

Il s'agit d'un groupe de molécules très diverses qui comprend plus de 100 facteurs sécrétés pouvant être subdivisés en plusieurs classes : interleukines (IL), facteurs de nécrose des tumeurs (TNF), interférons (IFN), facteurs de croissance transformants (TGF), facteurs de stimulation des colonies (CSF) et diverses chimiokines.

Les cytokines sont produites par les cellules T, les monocytes, les macrophages et les plaquettes, ainsi que par les cellules endothéliales (CE), les CML et les adipocytes, en réponse à l'inflammation et à d'autres stimuli. Une production accrue de cytokines pro-inflammatoires est liée à la progression de la maladie et favorise l'athérosclérose (Ait-Oufella et al. 2011). L'activation des CE induite par les cytokines peut provoquer un dysfonctionnement de l'endothélium accompagné d'une régulation à la hausse des molécules d'adhésion et des chimiokines, ce qui favorise la migration des cellules immunitaires (monocytes, neutrophiles, lymphocytes) vers le site inflammatoire (Szmitko et al. 2003). Les cytokines affectent également la fonction des CML en favorisant leur croissance, leur prolifération et leur migration (G. K. Hansson, Libby, et Tabas 2015). Aux stades ultérieurs de l'athérosclérose, les cytokines pro-inflammatoires favorisent la déstabilisation des plaques d'athérome, l'apoptose de diverses cellules et la dégradation de la matrice, accélérant ainsi la rupture des plaques et la formation de thrombus (G. K. Hansson, Libby, et Tabas 2015; Tabas, García-Cardena, et Owens 2015).

Nous allons énoncer ici quelques cytokines ayant un rôle important dans la plaque d'athérome.

Les cytokines peuvent être classées en 2 groupes : les cytokines de type I, qui sont produites par les cellules T_{helper} I (Th1) et les cytokines de type II, produites par les cellules T_{helper} II (Th2). Mais les cytokines produites par les cellules Th17 et les cellules T régulatrices (T_{reg}) sont également très importantes dans la pathogenèse de maladies auto-immunes.

ii. Cytokines de type I

Interféron gamma (INF γ)

La production de cette cytokine est particulièrement élevée dans les plaques d'athérosclérose et elle est produite par les cellules T CD4+, les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et les cellules natural killer (Ranjbaran et al. 2007). L'INF γ a un rôle pro-athérogène par sa capacité d'activation des macrophages (Koltsova et al. 2012), des lymphocytes T (Whitman, Ravisankar, et Daugherty 2002a), des cellules NK, des cellules B et des cellules musculaires lisses (Harvey et Ramji 2005). D'autre part, INF γ augmente l'expression du récepteur scavenger SRA des macrophages, facilitant ainsi le captage des LDL oxydé et la formation de cellules spumeuses (Wuttge et al. 2004).

Tumor necrosis alpha (TNF α)

Cette cytokine est pro-inflammatoire et elle est impliquée dans l'homéostasie cellulaire et la régulation de la réponse immunitaire (Kallioulas et Ivashkiv 2016). Elle joue un rôle clé dans le développement de l'athérosclérose. Elle est produite par les cellules T CD4+ et les cellules monocytaires de l'aorte. La progression de la plaque est toujours corrélée avec des accumulations locales de TNF α dans celle-ci ainsi qu'avec une hausse de la circulation sanguine (Canault et al. 2008). Des expériences réalisées sur des modèles doubles KO ApoE^(-/-) et TNF α ^(-/-) démontrèrent une diminution significative de la taille des plaques d'athéromes au niveau du sinus aortique par rapport aux souris ApoE^(-/-) causée par une diminution de l'expression d'ICAM-1 et VCAM-1 et MCP-1 (Ohta et al. 2005b).

iii. Cytokines de type II

Interleukine-4

Cette interleukine IL-4 favorise la différenciation des cellules Th2, cellules productrices de cytokines IL-5, IL-4 et IL-13. Son rôle dans l'athérosclérose est sujet à débat. Dans des modèles murins athéro-résistants, il fut constaté que la production de cytokines était orientée vers le type II, suggérant un rôle protecteur de ces cytokines (Huber et al. 2001). Cependant, chez des modèles murins ko au récepteur des LDL (LDLr^(-/-)) ; la déficience en-IL-4 n'avait aucun effet sur la progression de la plaque d'athérome (King, Cassis, et Daugherty 2007).

Interleukine-5 et 13

Ces deux cytokines semblent avoir un rôle anti-athérogénique. Des études ont indiqué que l'IL-13 avait un rôle de stabilisateurs de plaque par une hausse de la production de collagène, qu'elle entraînait une diminution de recrutement de monocytes par l'intermédiaire de VCAM-1 et réduisait l'accumulation de macrophages au sein des plaques (Cardilo-Reis et al. 2012). L'IL-5 stimule la production d'anticorps IgM neutralisant les LDL oxydés, conduisant à un rôle bénéfique dans les plaques (Binder et al. 2004b).

iv. Cytokines de type Th-17

Interleukine-17A

Le rôle de cette cytokine est controversé. Néanmoins, la majorité des études pointent vers un rôle athérogénique. Des souris ApoE^(-/-) avec le gène de l'IL-17A éteint, étaient caractérisées par une amélioration de la pathologie liée à une réduction de l'infiltration de monocytes et neutrophiles dans l'intima de l'aorte (Van Es et al. 2009).

Interleukine-6

Cette cytokine est relativement singulière car elle peut avoir à la fois pro et anti inflammatoire selon le contexte environnemental. Son rôle dans l'athérosclérose peut être délétère ou protecteur selon le stade de la pathologie (Xing et al. 1998; Kirii et al. 2003a; Fontes, Rose, et Čiháková 2015).

Interleukine-1

L'IL-1 (composé d'IL-1 α et IL-1 β) est une famille de cytokine pro inflammatoire produite par les cellules myéloïdes. Il s'agit d'une cytokine essentielle pour la différenciation des cellules Th17 (Mills 2008). La production d'IL-1 β dans l'athérosclérose dépend de l'activation de l'inflammasome NLRP3 causée par la dégradation dans les lysosomes de cristaux de cholestérol. L'inhibition de cette famille de cytokine réduit significativement l'athérosclérose (Mills 2008; Kirii et al. 2003b; Kamari et al. 2011).

Enfin nous pouvons citer les propriétés d'IL-10 et TGF β qui n'appartiennent pas aux groupes de cytokines mentionnés ci-dessus.

Interleukine-10

L'IL-10 régule le système immunitaire adaptatif et inné en inhibant l'activation des cellules Th1 et des macrophages, tout en stimulant la production d'anticorps par les lymphocytes B (K. W. Moore et al. 2001). Cette cytokine est produite par les cellules myéloïdes et par les cellules T_{reg}. Il fut démontré que l'inactivation de cette cytokine engendrait une accélération de l'athérosclérose causée par une hausse de l'infiltration de cellules inflammatoires associées à une production accrue de cytokines pro inflammatoires dans les plaques (Mallat et al. 1999; Caligiuri et al. 2003; Pinderski Oslund et al. 1999).

Transforming growth factor β

TGF β est exprimé dans la totalité des cellules de l'organisme, et est régulateur de cellules immunitaires par sa capacité à inhiber la prolifération, l'activation, et la différenciation de cellules Th1 et Th2. C'est une cytokine anti inflammatoire, et elle est également nécessaire pour la différenciation des cellules T_{reg}, ce qui lui confère un rôle anti-athérogénique essentiel (Lutgens et Daemen 2001). Le tableau ci-après résume les différentes cytokines impliquées dans l'athérosclérose (Tableau 9).

Tableau 9 Action des cytokines dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Fatkhullina, Peshkova, et Koltsova 2016).

Cytokines	Producteurs	Cibles	Rôle dans l'athérosclérose
IFN-γ	Cellules Th1 Cellules NK Cellules T CD8+	Macrophages Cellules T CD8+ Cellules NK Cellules B Cellules musculaires lisses	Pro-athérogène : active les cellules cibles et favorise l'expression de la SR-A, qui sert de médiateur pour l'absorption de l'oxLDL par les macrophages.
TNF	Cellules Th1 Cellules myéloïdes	Macrophages Cellules Th1 Cellules endothéliales	Pro-athérogène : régule l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) et de la protéine chemoattractante monocyte-1 (MCP-1)
IL-4	Cellules Th2 Cellules B Cellules endothéliales	Cellules T Cellules B Cellules endothéliales	Pro-athérogène : induit l'inflammation par la régulation à la hausse des médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, telles que l'ICAM-1) dans les CE.
IL-5	Cellules Th2	Cellules B	Anti-athérogène : stimule la production d'anticorps anti-oxLDL (IgM) par les cellules B
IL-13	Cellules Th2 éosinophiles	Cellules endothéliales Macrophages	Anti-athérogène : induit la production TGF β par les macrophages ; inhibe le recrutement des monocytes dépendant de la VCAM-1 par l'endothélium
IL-17	Cellules th17 Cellules T	Macrophages neutrophiles Cellules T	Pro-athérogène : favorise l'infiltration dans l'intima de monocytes et de neutrophiles dépendant de la chimiothérapie ; régule l'expression de VCAM-1 ; favorise la sécrétion de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , CCL5) antiathérogène : augmente soi-disant la production d'IL-5 et diminue la production d'IFN- γ
IL-6	Macrophages Cellules endothéliales	Macrophages Cellules Th1	Pro-athérogène : favorise les stries graisseuses antiathérogène : induit l'IL-1RA et la libération de TNF- α soluble, qui à leur tour suppriment la production de molécules pro-inflammatoires
IL-12	Macrophages Cellules dendritiques	Cellules Th1 Cellules myéloïdes	Pro-athérogène : régule la différenciation des cellules Th1 au stade précoce
IL-23	Macrophages Cellules dendritiques	Cellules Th17	Possiblement athérogène
IL-27	Macrophages Cellules dendritiques	Cellules endothéliales Cellules hématopoïétiques	Anti-athérogène : supprime l'activation des cellules T CD4+ ; réduit l'accumulation d'oxLDL dans les macrophages
IL-1α IL-1β	Cellules myéloïdes Macrophages	Cellules Th17 Cellules endothéliales Macrophages	Pro-athérogène : régule l'activation des CE et des macrophages et la différenciation des cellules Th17.
IL-10	Cellules Treg Cellules myéloïdes	Cellules Th1 Macrophages Cellules B	Antia-thérogène : supprime l'activation des cellules Th1 et des macrophages ; contribue à la survie des cellules B et à la production d'anticorps.
TGF-β	Cellules endothéliales Cellules hématopoïétiques Cellules du tissu conjonctif	Cellules Th1 et Th2 Th2 Cellules Treg	Antia-thérogène : inhibe la prolifération, l'activation et la différenciation des cellules Th1 et Th2 ; stimule l'expression de FoxP3 et la différenciation de Tregs.

Comme nous avons pu le constater, l'athérosclérose est une maladie complexe multifactorielle, qui fait intervenir des acteurs divers de l'immunité innée et adaptative. Plus globalement cette pathologie résulte d'interactions entre des facteurs génétiques et environnementaux qui peuvent être modifiés par l'exposition aux rayonnements ionisants. Dans la partie suivante, nous allons faire une revue de littérature portant tout d'abord sur les effets qui ont été observés, expérimentalement, sur les différents médiateurs du système immunitaire après exposition à des faibles doses de rayonnements ionisants, car bon nombre d'entre eux sont impliqués dans l'athérosclérose. Ensuite nous traiterons des travaux préexistants aussi bien en épidémiologie qu'en science expérimentale sur l'impact des faibles doses de rayonnements ionisants dans l'athérosclérose.

IV. Impact des rayonnements ionisants sur l'athérosclérose et le système immunitaire

1. Effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur le système immunitaire

Comme évoqué précédemment, les effets des faibles doses de rayonnements ionisants ont fait l'objet d'un intérêt scientifique accru. Il s'avère que contrairement aux fortes doses, l'exposition aux doses faibles permet de promouvoir la croissance et le développement cellulaire, de diminuer le processus de vieillissement, de stimuler les fonctions immunitaires, et retarder l'apparition de cancer (Luckey 1982). Ce phénomène que nous avons précédemment identifié comme étant l'hormèse radio-induite (Anderson et Lefkovits 1979), a attiré l'attention de nombreux scientifiques.

Le système immunitaire, un des principaux mécanismes de défense de l'organisme contre les agressions environnementales, est fortement affecté par les rayonnements ionisants. A faible dose, ces rayonnements modulent différents processus immunitaires pouvant enclencher des réponses qualifiées d'hormétique. Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré que cet effet régulateur des faibles doses de rayonnements ionisants dépend de nombreux facteurs, tel que le statut des cellules immunitaires, le microenvironnement tissulaire et l'interaction entre les acteurs cellulaires (Anderson et Lefkovits 1979; S Kojima et al. 2000).

Dans cette partie nous allons reprendre différentes études expérimentales portant sur ce type d'exposition sur les acteurs du système immunitaire.

A. Voie du NF KB

Le facteur de transcription NF KB est très important dans l'immunité innée car il permet l'expression de nombreuses molécules effectrices du système immunitaire, comme les molécules d'adhésion, les cytokines ou des enzymes comme l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). L'étude de Prasad et son équipe (Prasad et al. 1994) a démontré une hausse de l'induction de cette voie à la dose de 0.5 Gy. De plus, Rödel et son équipe (Rödel et al. 2004) ont observé une réponse bi-phasique dans l'activité de NF KB, avec une stimulation à 0.5 Gy suivi d'une diminution aux doses comprises entre 0.6 et 0.8 Gy puis une nouvelle augmentation à partir de 1 Gy, ce qui témoigne d'une non linéarité des effets à faible doses de rayonnements ionisants.

B. Monocytes et Macrophages

Une étude d'Arenas et son équipe (Arenas et al. 2006) s'est intéressée aux effets des irradiations à faibles doses sur l'inflammation chez la souris. A cette fin, des souris C57/Bl6 ont été irradiées à faibles doses (0.1, 0.3 et 0.6 Gy), puis du lipopolysaccharide (LPS) leur a été injecté afin de provoquer une inflammation systémique. Les auteurs ont pu observer que l'injection de LPS entraînait une adhésion leucocytaire très importante, mais que le nombre de leucocytes adhérent était significativement réduit aux 3 doses d'exposition, avec une plus forte inhibition à 0.3 Gy. De plus la cytokine $TGF\beta_1$ était augmentée dans la circulation parmi les groupes exposés ou non avec du LPS démontrant un effet anti inflammatoire de l'exposition des faibles doses de rayonnements ionisants.

La production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages est un élément essentiel dans l'inflammation, en effet le NO augmente la perméabilité vasculaire, contribue à la formation des œdèmes, et est impliqué dans la douleur inflammatoire. Il a été observé que des doses modérées d'irradiation (<1 Gy) appliquées à des macrophages murins avant et après leur stimulation par du LPS et INF γ ont entraîné une diminution de la production de NO (Trott 1998). Une étude additionnelle a montré que la production de cytokines TNF α induite par les LPS était inhibée chez les macrophages irradiés à de faibles doses (Tsukimoto et al. 2009a). Enfin, une dernière étude expérimentale portant sur ces cellules, a montré une baisse de l'activité oxydative de la production d'ions superoxydes après une irradiation entre 0.3 et 0.6 Gy. Les auteurs notent une réponse non linéaire avec la dose et dépendante des propriétés immunologiques des macrophages (D. Schae, Marples, et Trott 2002a).

Les macrophages bénéficient d'une certaine plasticité et sont capables d'adapter leur phénotype en réponse à certains stimuli. Des études ont donc également porté sur la polarisation de ces cellules.

Klug et son équipe (Klug et al. 2013) ont observé que les faibles doses d'irradiation favorisent la différenciation des macrophages vers un phénotype M1, pro inflammatoire. Cependant l'étude de Kojima, 2006 (Shuji Kojima 2006) montre l'effet inverse avec une stimulation de la voie M2 des macrophages. Ces éléments pris ensemble, suggèrent une forte influence des faibles doses de rayonnements ionisants sur l'activité, la sécrétion et dans la polarisation des macrophages.

C. Cellules dendritiques

Nous avons vu précédemment que les cellules dendritiques jouent un rôle essentiel en tant que cellules présentatrices d'antigène. L'activité immunologique de ces cellules dépend fortement de leur état de différenciation et de maturation. L'étude de Jahns et son équipe (Jahns et al. 2011) a montré que l'irradiation des précurseurs de CD à 0.5 Gy *in vitro* n'influence pas l'expression du marqueur de surface ou la sécrétion en cytokines des cellules dendritiques matures ou immatures après traitement aux lipopolysaccharides (LPS). A l'opposé, l'étude de Shigematsu et son équipe (Shigematsu et al. 2007) rapporte que l'exposition de CD à la dose de 0.05 Gy conduisait à une plus grande capacité de prolifération des cellules T, et une augmentation de la production d'IL-2, d'IL-12 et d'INF γ . Ces résultats contradictoires pourraient être liés aux variabilités inter-laboratoire en matière de doses, de débits de doses et de protocoles expérimentaux.

D. Cellules « Natural Killer »

Des études *in vivo* et *in vitro* indiquent que les faibles doses de rayonnements ionisants renforçaient l'activité des cellules NK en stimulant la prolifération cellulaire et leurs fonctions cytotoxiques (Yang et al. 2014; Cheda et al. 2004; Hashimoto et al. 1999). De plus, l'étude de Sonn et son équipe montre que les faibles doses peuvent amplifier la cytotoxicité des cellules NK préalablement exposé à de faibles niveaux d'IL-2 ou d'autres pathogènes (Sonn et al. 2012). Cette potentialisation de l'activité induite par les faibles doses d'irradiation serait liée à l'élévation de la production en glutathion et de la sécrétion de cytokines IL-2, IL-12, INF γ et TNF α (Cheda et al. 2008; Shuji Kojima 2006). Une des voies possibles serait celle de la MAPK (Yang et al. 2014) fréquemment sollicitée lors de la réponse adaptative.

E. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales permettent de réguler l'inflammation locale par leur capacité à recruter des leucocytes et d'exprimer une variété de chimiokines et de cytokines.

Il est avéré que l'exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants des cellules endothéliales réduit l'expression de la sélectine-E (Roedel et al. 2002; Hildebrandt et al. 2002b). Il a aussi été observé une augmentation de l'expression de cytokines anti-inflammatoires (TGF- β et d'IL-10) après irradiation (Mosmann 1994) ainsi qu'une diminution de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (Roedel et al. 2002; Hildebrandt et al. 2002b; Kern et al. 2000).

Hildebrandt et son équipe (Hildebrandt et al. 2002a) ont par ailleurs observé que l'exposition de CE à de faibles doses d'irradiation inhibait l'expression de Sélectine-E lorsque les CE étaient activés, et tout particulièrement à la dose de 0.3 Gy.

Plus récemment, Schröder et son équipe (Schröder et al. 2019) ont exposé des cellules endothéliales humaines à des doses faibles d'irradiation. Les cellules endothéliales activées ou non-activées ont été irradiées à des doses comprises entre 0.01 et 2 Gy de rayons X, puis des mesures de sécrétions ou d'expression de gènes de cytokines et de facteurs de croissances ont été effectués à différents temps après irradiation. Les auteurs ont identifié une relation dose réponse non linéaire de l'expression et de la sécrétion d'IL-8 et insiste sur les propriétés immunomodulatrices des effets à faibles doses sur les cellules endothéliales.

F. Lymphocytes T

Les lymphocytes T sont essentiels à l'immunité par médiation cellulaire. L'exposition de ces cellules à de faibles doses d'irradiation a montré une tendance à l'augmentation des sous populations de lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Shankar et Sainis 2005; Song et al. 2015; S. Liu, Han, et Liu 1994) traduisant une potentialisation de l'action immunitaire causée par cette exposition.

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'effet régulateur des faibles doses de rayonnements ionisants sur l'immunité des cellules T peuvent impliquer les voies du NF- κ B, de la MAP-kinase, et la kinase c-Jun N-terminale (JNK), et une capacité accrue des cellules T à produire des cytokines pro inflammatoires (Rizvi et al. 2011).

Concernant les lymphocytes T régulateurs, des résultats contradictoires sont à rapporter ; les travaux de Liu (R. Liu et al. 2010a) montrent une diminution du nombre de lymphocytes T_{reg} chez le rat après irradiation à faibles doses. Néanmoins, sur des études portant sur des animaux souffrant de pathologies auto-immunes telles que l'arthrite, il a été observé une augmentation du nombre de lymphocytes T_{reg} après une exposition aux faibles doses de rayonnements ionisants (Nakatsukasa et al. 2010; Weng et al. 2010). Cela suggère que le microenvironnement pathologique, associé à la dose et au débit de dose sont très importants dans la réponse immunitaire après exposition à de faibles doses.

Enfin nous pouvons citer d'autres études telle que l'étude de Shin et son équipe (Shin et al. 2010) qui ont exposé des souris C57/Bl6 à des doses cumulées de 0.2 et 2 Gy et à de faibles débits de doses (0.7 mGy.h⁻¹ et 3.95 mGy.h⁻¹ respectivement). Un panel large de cytokines a été mesuré dans la circulation sanguine, le poids des souris et la composition en cellules sanguines a aussi été contrôlé. L'analyse de sécrétion en cytokines montrent une hausse de la concentration d'IL-3, IL-4, de leptines, de MCP-1, MCP-5, MIP-1 α , de thrompoïétine et de facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) associé à une légère réduction de l'IL-12p, IL-13, IL-17 et INF γ démontrant un effet de suppression de la réponse pro inflammatoire, favorisant la différenciation de cellules T naïves en lymphocytes T-helper 2 plutôt que T-helper 1.

Une autre approche portant cette fois sur une exposition par contamination interne a été réalisée par Bertho et son équipe (Bertho et al. 2011) sur des souris BALB/C. Celles-ci ont été contaminées par du ¹³⁷Cs présent dans de l'eau contaminée à une activité de 20 kBq.l⁻¹ de façon chronique. Les résultats suggèrent que l'ingestion chronique d'eau contaminée au ¹³⁷Cs à faible dose n'entraîne pas d'impact sur les cellules immunitaires sanguines, les thymocytes et sur le système immunitaire en général.

A contrario, et plus récemment, les travaux de Candéias et son équipe (Candéias et al. 2017) ont porté sur les effets des faibles doses sur les lymphocytes T chez des souris CBA/Ca et en particulier sur le répertoire génique des récepteurs des cellules T. Les animaux ont été irradiés aux doses de 0.1 ou 1 Gy et il a été observé un effet de « vieillissement » dans le répertoire génique des récepteurs des cellules T, avec des effets plus prononcés à 0.1 Gy qu'à 1 Gy. Ces effets à faible dose proviendraient, en partie d'une altération des cellules souches hématopoïétiques.

Ces résultats contrastés démontrent la complexité des mécanismes survenant à faible dose incluant la non-linéarité des réponses biologiques induites par ce type d'exposition, et l'importance du type cellulaire ou tissulaire étudié et les modalités d'exposition.

G. Maladies auto-immunes

De nombreuses pathologies sont reliées à des anomalies du système immunitaire. Lorsque le système immunitaire décline, cela peut provoquer l'apparition de tumeurs malignes ou d'infections opportunistes potentiellement mortelles. A l'inverse, les maladies auto-immunes résultent d'une hyper activation du système immunitaire qui attaque le tissu sain. Les effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur le système immunitaire dépendent du microenvironnement immunitaire. Dans différentes pathologies auto-immunes, l'application de faibles doses permet une modulation de l'action immunitaire.

Plusieurs modèles animaux ont été utilisés dans le but d'analyser les effets des rayonnements ionisants utilisés en radiothérapie sur des pathologies inflammatoires notamment l'arthrite, une pathologie inflammatoire des articulations. Les doses appliquées de l'ordre de 0.5 à 1.4 Gy sont des faibles doses au regard des doses appliquées dans le cadre de traitement de radiothérapie.

Des lapins souffrant d'arthrite aiguë des genoux, ont été traités avec des doses hebdomadaires de 1.4 Gy pendant 5 semaines entraînant une réduction de la prolifération de l'inflammation dans le tissu synovial (Budras, Hartung, et Münzer 1986). Une seconde étude similaire, sur des modèles d'arthrite aiguë induits chez le rat a démontré qu'une irradiation journalière pendant 4 jours à 1 Gy provoquait une réduction de pertes osseuses et une réduction de la dégradation du cartilage (Trott s. d.).

Les effets des faibles doses de radiothérapie sur la progression morphologique et clinique de l'ostéoarthrite ont été évalués chez le rat. Dans le modèle d'induction de l'arthrite, l'irradiation locale des articulations enflammées par des doses fractionnées (5*0.5 Gy ou 5*1 Gy) ont induit un effet anti-inflammatoire, avec réduction significative de la destruction d'os et de cartilage (G. Hildebrandt 2000; 2000; Liebmann et al. 2004).

Plus récemment, un modèle de souris NMRI exposées à des doses entre 0.5 et 5 Gy a été utilisé pour analyser l'expression de cytokines pro-inflammatoires et d'HSP-70 lors de la phase aiguë de l'inflammation. Le nombre de cellules pro-inflammatoires était inchangé, cependant l'expression de NO inducible était atténué de façon concomitante avec une expression augmentée de HO-1 et HSP-70 (Dörthe Schae et al. 2005b). Ces études confirment un mécanisme *in vivo* engendré par l'exposition à des faibles doses d'irradiation de modulation des cellules inflammatoires. Ces résultats confirment *in vivo* les propriétés immunomodulatrices d'une exposition à de faibles doses d'irradiation. Le tableau ci-dessous (Tableau 10) fait une synthèse des différents effets observés dans les études précédemment évoquées

Tableau 10 Liste non exhaustive des effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur la réponse immunitaire.

Auteurs	Modèle d'étude		Dose	Effets
(Arenas et al. 2006)	Monocytes et macrophages	Inflammation systémique de modèle murin avec du LPS	0.1, 0.3, 0.6 Gy	Adhésion leucocytaire ↓ TGFβ ↑
(D. Schae, Marples, et Trott 2002b)		Macrophages	0.3-0.6 Gy	↓ stress oxydatif (0.3-0.6 Gy)
(TROTT 1998)		Macrophages murins stimulés par du LPS et INFγ	<1 Gy	↓ production de NO
(Tsukimoto et al. 2009b)		Macrophages murins stimulés par du LPS	0.5 Gy	↓ production de TNFα
Klug(Klug et al. 2013)		Macrophages murins (souris C3H)	0.5-6 Gy	↑ INOS ⁺ et phénotype M1
(Shuji Kojima 2006)		Macrophages murins	0.5 Gy (dose répétée)	
(Jahns et al. 2011)	Cellules dendritiques		0.5 Gy	Absence d'effets
(Shigematsu et al. 2007)			0.05 Gy	↑ prolifération cellulaire ↑ IL-2, IL-12, INFγ.
(Yang et al. 2014; Cheda et al. 2004; Hashimoto et al. 1999)	Cellules Natural Killer		0.1, 0.2, 0.5 Gy	↑ prolifération cellulaire ↑ activité cytotoxique ↑ IL-2, IL-12, INFγ ↑ Glutathion
(Rödel et al. 2004; Hildebrandt et al. 2002a)	Cellules endothéliales		0.3-0.7 Gy	↑ TGFβ ↓ Sélectine-E ↓ adhésion leucocytaire
(Schröder et al. 2019)			0.01, 2 Gy	Réponse non linéaire avec la dose pour IL-8
(Mosman 1994)			Faibles doses	↑ TGFβ, IL-10
(Prasad et al. 1994)			0.25, 0.5 Gy.	↑ NF KB
(Rödel et al. 2004)			0.8, 0.6 Gy	↓ NF KB
(Shankar et Sainis 2005; S. Liu, Han, et Liu 1994; Song et al. 2015)	Lymphocytes T	Cellules T	0.01, 1 Gy	↑ cellules T CD4 ⁺ , CD8 ⁺
(R. Liu et al. 2010a)		Souris porteuse de tumeurs	1.25 Gy	↓ T _{reg}
(Nakatsukasa et al. 2010; Weng et al. 2010)		Modèles de lapin développant de l'arthrite	0.5 Gy	↑ T _{reg}
(Shin et al. 2010)		Modèle murin C57/Bl6 Lymphocytes T	0.2-2 Gy	↑ IL-3, IL-4, leptines, de MCP-1, MCP-5, MIP-1α, thrompoïétine, VEGF. ↓ IL-12p, IL-13, IL-17 et INFγ
(Bertho et al. 2011)		Souris BALB/C Thymocytes	20 kBq.l ⁻¹	Absence d'effets
(Candéias et al. 2017)		Souris CBA/ca	0.1, 1 Gy	Vieillesse du répertoire génétique
(Budras, Hartung, et Münzer 1986)	Maladies auto-immunes	Modèle de lapin avec arthrite du genou	1.4 Gy	↓ inflammation
(Trott s. d.)		Arthrite chez le rat		↓ dégradation du cartilage
(G. Hildebrandt 2000; 2000; Liebmann et al. 2004)		Souris NMRI	5*0.5 Gy/5*1 Gy	↓ inflammation ↓ réduction du cartilage
(Dörthe Schae et al. 2005b)		Modèle de souris avec inflammation induite	0.5, 5 Gy	↓ Expression de NO

2. Impact des rayonnements ionisants dans la pathologie athéromateuse

A. Données épidémiologiques.

i. Exposition à fortes doses

Les premiers travaux concernant les effets des rayonnements ionisants sur les pathologies cardiovasculaires ont porté en premier lieu sur l'exposition à de fortes doses. Cela est en partie dû au développement de nouvelles méthodes thérapeutiques de lutte contre le cancer et l'apparition de tumeurs avec notamment la radiothérapie. Ces traitements bien qu'efficaces, ont conduit à l'exposition des patients à fortes doses de rayonnements ionisants et conduit à des effets indésirables cardiovasculaires à plus ou moins long terme. En parallèle des études sur les survivants des bombardements atomiques d'Hiroshima et Nagasaki lors de la Seconde Guerre mondiale ont pu inclure des dizaines de milliers de personnes ayant été exposés à des doses atteignant 4 Gy et ont montré des conséquences délétères sur la santé y compris au niveau cardiovasculaire. Nous ferons, dans cette partie, une rapide synthèse des effets observés après exposition à fortes doses à partir des études de cohorte portant sur la radiothérapie et sur les bombardements atomiques de Hiroshima et Nagasaki.

Etude de radiothérapie

Une des premières études sur les conséquences au niveau cardiovasculaire des radiothérapies a été réalisée par Boivin en 1992 (Boivin et al. 1992). Elle portait sur des patients traités pour la maladie de Hodgkin par une irradiation au niveau du médiastin, qui est une zone de la cage thoracique contenant notamment le cœur. Les auteurs ont ainsi constaté un excès du risque de mortalité par infarctus du myocarde chez les patients traités par radiothérapie par rapport à ceux ayant été traités uniquement par chimiothérapie.

Plus récemment, McGale et son équipe (McGale et al. 2011) ont étudié l'incidence d'évènement cardiovasculaire après radiothérapie chez plus de 70 000 femmes atteintes de cancer du sein. Ils ont pour cela comparé des patientes ayant des tumeurs au sein gauche ou au sein droit en vue d'établir un risque lié à l'irradiation. Les auteurs ont constaté que la latéralité des tumeurs n'entraînait pas de différence en matière de mortalité cardiovasculaire. Plus généralement, ils concluent que la radiothérapie du cancer du sein augmente le risque de développer une cardiopathie ischémique, une péricardite et une maladie des valves.

Concernant le cancer infantile, Mulrooney et son équipe (Mulrooney et al. 2016) ont analysé les conséquences cardiaques à l'âge adulte de radiothérapie délivré lors de l'enfance pour le traitement de cancer. Ils ont également identifié un excès de risque cardiovasculaire chez les patients traités.

Effets des bombardements d'Hiroshima et Nagasaki

Shimizu et son équipe (Shimizu et al. 2010) ont étudié les données provenant d'une cohorte, plus de 50 ans après exposition aux bombardements atomique d'Hiroshima et Nagasaki, incluant 86 611 personnes ayant été exposées à des doses allant de 0 à plus de 3 Gy lors du bombardement. Le suivi de ces populations a indiqué que les individus de l'étude ayant été exposé à des doses supérieures à 0.5 Gy avaient un risque accru d'AVC ou pathologies cardiovasculaires.

Les auteurs ne parviennent cependant pas à déterminer s'il existe ou non un risque pour les doses inférieures à 0,5 Gy correspondant à une dose modérée.

Les études épidémiologiques portant sur les fortes doses ont ainsi clairement pu établir un lien clair entre expositions à des doses élevées de rayonnements et la survenue de maladies cardiovasculaires. On note cependant les propos nuancés de Shimizu au sujet des doses inférieures à 0.5 Gy. En effet, contrairement aux effets à fortes doses de rayonnements ionisants, il est beaucoup plus complexe d'établir une relation claire entre une exposition à des doses faibles et la survenue d'évènements cardiovasculaires, notamment à cause de nombreux facteurs confondants pouvant engendrer des biais d'interprétation.

Dans la partie suivante nous allons étayer les études portant sur des cohortes exposées à faibles doses et les potentielles conséquences sur les pathologies cardiovasculaires.

ii. Exposition à faibles doses

Azizova et son équipe (T. V. Azizova et al. 2010; Tamara V. Azizova et al. 2012; T. V. Azizova et al. 2014; T. Azizova et al. 2015; T. V. Azizova et al. 2015) ont réalisé plusieurs études portant sur des travailleurs du complexe nucléaire de Mayak en Russie lors d'une période située entre 1948 et 1958, les travailleurs ont été suivis pendant plus de 50 ans. Les auteurs se sont notamment intéressés à l'incidence et à la mortalité d'évènements cardiovasculaires notamment en lien avec leur exposition à des rayonnements γ externe. Il a été observé une hausse générale des maladies cardiaques de type ischémique (IHD) avec une hausse de la dose d'exposition (supérieur à 0,1 Gy), cela est en accord avec les études citées dans la partie « Fortes doses ». Les auteurs notent cependant une baisse significative du nombre d'IHD chez les travailleurs exposés à des doses externes de rayons gamma de 0,2-0,5 Gy. Cette diminution du risque est fortement influencée par les travailleurs de sexe féminin (Tamara V. Azizova et al. 2012).

Nous pouvons ensuite citer les travaux de Schöllnberger et son équipe (Schöllnberger et al. 2018), dont l'étude se base sur la même population d'intérêt que celle de Shimizu, exposées aux retombées radioactives des bombardements d'Hiroshima et Nagasaki. Les auteurs ont utilisé un modèle de multi-inférence (MMI), une méthode statistique permettant de superposer différents modèles d'estimation du risque lié à la dose. Cela permet une détermination plus précise de la relation dose-réponse et une caractérisation plus complète des incertitudes. L'analyse ne parvient pas à conclure s'il existe un risque de maladies cérébrovasculaires (CeVD) quand la dose est inférieure à 0,75 Gy ou sur les pathologies cardiaques quand la dose est inférieure à 2,6 Gy. Les auteurs suggèrent que la courbe dose-réponse est sublinéaire pour les maladies cérébro-vasculaires et les pathologies cardiaques pour les doses faibles à modérées.

Dans sa revue sur les effets cardiovasculaires reliés à l'exposition aux faibles doses de rayonnements ionisants, Baselet et son équipe (Baselet et al. 2016) indique que du fait de la puissance statistique limitée, la relation dose-risque n'est pas étayée pour des doses inférieures à 0.5 Gy.

B. Données expérimentales

L'étude de Mitchel, 2013 (Mitchel et al. 2013) a consisté à exposer des souris ApoE^(-/-) à des doses modérées d'irradiation (0,25 à 0,5 Gy). Les doses ont été appliquées aussi bien en aiguë, avec un débit de dose de 150 mGy.min⁻¹, qu'en chronique avec un débit de dose de 1 mGy.min⁻¹. Ces souris ont été exposées soit à un stade précoce de l'athérosclérose (souris âgées de 2 mois) ou à un stade tardif (souris âgées de 8 mois). Ces différentes expositions, à fort et faible débits de dose, ont induit, chez les souris exposées à un stade précoce, une atténuation de la formation de nouvelles lésions tout en réduisant l'augmentation de taille des lésions existantes. Cependant, ils ont constaté une progression de la gravité des lésions à fort débit de dose. Les mêmes observations s'appliquent chez les souris exposées à un stade tardif pour les faibles débits de dose. Par ailleurs, en exposition aiguë, les auteurs observent une réduction de la gravité des lésions suggérant un effet adaptatif, à l'inverse de ce qui avait été constaté chez les souris exposées précocement. Les auteurs ont également observé que les souris ayant subi une atténuation du gène codant pour p53 subissaient des effets délétères au niveau des plaques d'athérosclérose après irradiation, tandis que celles avec le gène intact conservait l'effet adaptatif lié aux irradiations.

Une seconde étude de Mancuso, 2015 (Mancuso, Pasquali, Braga-Tanaka, et al. 2015) a évalué les effets d'une exposition chronique et aiguë sur des modèles de souris femelles ApoE^(-/-). En chronique, ces souris ont été irradiées pendant 300 jours par des rayons γ avec 2 débits de doses (1 mGy.jour⁻¹ et 20 mGy.jour⁻¹), pour une dose totale cumulée de 0,3 et 6 Gy respectivement. En aiguë, les souris ont été irradiées par une dose unique de 0,3 ou 6 Gy, puis euthanasiées 300 jours après irradiation. Les résultats suggèrent qu'une dose modérée de 0,3 Gy peut avoir des effets délétères au niveau cardiovasculaire mais essentiellement en exposition aiguë, ce risque reste beaucoup plus élevé à 6 Gy quel que soit le débit de dose.

Enfin, Le Gallic et son équipe, 2015 (Le Gallic et al. 2015b) ont investigué les effets d'une exposition chronique interne au césium-137 sur l'athérosclérose sur des souris ApoE^(-/-). Les doses journalières utilisées d'exposition de 0, 4, 20, et 100 kBq.L⁻¹ de Césium-137 pendant 6 et 9 mois correspondent aux intervalles de concentrations mesurées dans les territoires contaminés tels que Tchernobyl et Fukushima. Les résultats suggèrent qu'une exposition chronique à faible doses de ces souris améliore la stabilité des lésions par inhibition des cytokines pro-inflammatoires et la production des métalloprotéinases matricielles (MMP). Par ailleurs, une seconde étude portant sur un modèle in vitro de cellules endothéliales a démontré l'importance du débit de dose dans l'altération du profil inflammatoire et de la fonction cellulaire (T. Ebrahimian et al. 2015).

Une autre étude menée sur une exposition en irradiation gamma externe chronique à faible dose et faible débit de dose (T. G. Ebrahimian et al. 2018) a mis en évidence une stimulation des systèmes de défense antioxydants et anti-inflammatoires.

Ces résultats obtenus à de relativement faibles doses d'exposition pourraient suggérer l'existence d'un phénomène de radio-adaptation ou d'effet hormétique. En effet, une exposition à faible dose et faible débit de dose semble avoir un effet régulateur et non-potentialisant sur l'athérosclérose.

Plus spécifiquement, les résultats de Le Gallic et son équipe 2015 (Le Gallic et al. 2015b) et Ebrahimian et son équipe 2017 (T. G. Ebrahimian et al. 2018) semblent suggérer que la stimulation des systèmes de défense anti inflammatoires et antioxydants est due à un mécanisme d'adaptation aux rayonnements ionisants dans le cas d'expositions chroniques à faibles doses. Ce processus d'adaptation pourrait objectiver la baisse observée des macrophages intra plaques (Figure 30), la baisse de la taille des plaques et l'augmentation observée du collagène intra-plaque observée dans les modèles expérimentaux utilisés.

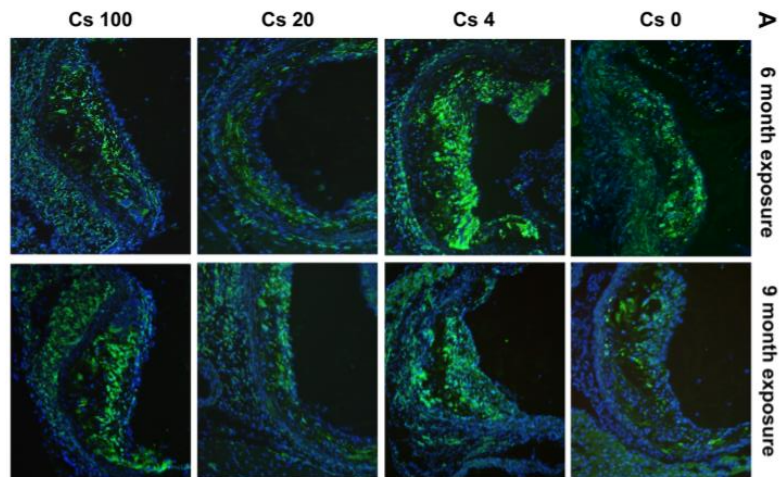


Figure 30 Effets d'une exposition au césium sur la composition des plaques d'athérosclérose en macrophage.

Immunomarquage des macrophages identifié par CD68 (vert). une exposition 6 mois à 20 et 100 kBq/l au ^{137}Cs entraîne une réduction du taux de macrophage intraplaque (Le Gallic et al. 2015b).

La connaissance des différents mécanismes d'immunomodulation mis en jeux est fondamentale à la compréhension du phénomène de radio-adaptation observé lors d'une exposition externe à différentes doses et débits de doses de rayonnements ionisants.

Problématiques

PROBLEMATIQUES

L'étude des effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur la santé humaine est actuellement un enjeu majeur de santé publique. Un nombre croissant de personnes peuvent être exposés aux rayonnements ionisants par le biais de l'exposition médicale, professionnelle, naturelle ou accidentelle. La compréhension des mécanismes biologiques engendrés par une telle exposition est donc essentielle afin de développer des outils permettant de protéger les populations exposées.

Parmi les pathologies non-cancéreuses, l'athérosclérose, une pathologie inflammatoire chronique des vaisseaux de gros et moyens calibres est à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires et est fortement impactée par l'exposition aux rayonnements ionisants à fortes doses.

L'effet d'une exposition à faibles doses sur l'athérosclérose n'est pas encore clairement établi. Plusieurs études expérimentales ont montré que l'exposition à des faibles doses de rayonnements ionisants sur des modèles *in vitro* et *in vivo* favorise un mécanisme adaptatif entraînant une modulation inflammatoire en induisant un phénotype lésionnel moins inflammatoire et plus stable. Des mécanismes de modulation de l'inflammation ont été observés dans des modèles animaux « mimant » la pathologie athéromateuse indiquant qu'une exposition à faible dose pourrait avoir un effet « protecteur » dans le contexte de l'athérosclérose.

La compréhension de ces mécanismes immunomodulateurs à faible dose de rayonnements ionisants dans le contexte de l'athérosclérose est donc un élément majeur afin d'affiner nos connaissances dans le domaine des réponses radio-adaptatives. Le Laboratoire de radiotoxicologie et radiobiologie expérimentale (LRTOX) de l'IRSN dans lequel ce travail de thèse a été réalisé, a intégré cette thématique de recherche dans le cadre de la stratégie scientifique de l'IRSN.

Ainsi, l'objectif de cette thèse est de définir ces mécanismes de modulation immunitaire dans le contexte pathologique de l'athérosclérose. Pour cela, il s'agira d'identifier les acteurs immunitaires intervenant dans cette modulation, et de caractériser de quelle façon la dose, le débit de dose et les délais de latence après irradiation peuvent influencer cette réponse radio-induite.

Afin de répondre à ces interrogations, nous avons utilisé des modèles murins prédisposés à l'athérosclérose que nous avons exposés par irradiation externe à différentes doses et débits de doses γ .

Dans une première étude, nous avons cherché, par des techniques d'immunophénotypage, à identifier l'impact des faibles doses de rayonnements ionisants parmi différentes populations immunitaires impliqués dans la formation et le développement de l'athérosclérose. En comparant notamment les effets sous-jacents à une irradiation à débit de dose aiguë et chronique.

Dans une seconde étude, nous avons identifié les acteurs immunitaires à court terme après irradiation à différentes doses et les conséquences sur le processus athéromateux à long terme.

Matériels
&
Méthodes

MATERIELS ET METHODES

I. Etude des effets à doses faibles et modérées de rayonnements γ sur des modèles murins ApoE^(-/-) prédisposés à l'athérosclérose : immunophénotypage des populations monocytaires sanguines et lymphocytaires spléniques et étude de l'expression génique en molécules d'adhésions et de cytokines aortiques

1. Animaux et irradiations

Afin d'étudier les effets des doses faibles à modérées de rayonnements ionisants sur l'athérosclérose, des souris ApoE^(-/-) mâles âgés de 6 à 8 semaines ont été irradiés (γ) en corps entier aux doses de 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1 Gy. Deux débits de dose ont été appliqués, un faible débit de dose chronique à 1.4 mGy.h⁻¹ et un débit de dose élevé de 50 mGy.h⁻¹. Entre 5 et 8 souris ont été utilisées par groupe. Tous les animaux ont été euthanasiés 10 jours après la fin de l'irradiation en prenant en compte le temps de récupération post-irradiation. Les temps de récupération sont indiqués ci-dessous (Tableau 11).

Tableau 11 Modalités d'irradiation à doses faibles et modérées des souris ApoE^(-/-) à des débits de doses chroniques et aiguës - les temps de latence après irradiation sont également indiqués.

Non Irradié N=8	Groupe contrôle	
Exposition chronique (1,4 mGy.h ⁻¹) N= 5 animaux /doses	2 jours	50 mGy
	4 jours	100 mGy
	8 jours	200 mGy
	20 jours	500 mGy
	30 jours	750 mGy
	40 jours	1000 mGy
Exposition aiguë (50 mGy.h ⁻¹) N= 5 animaux/doses	1 h	50 mGy
	2 h	100 mGy
	4 h	200 mGy
	5 h	500 mGy
	7,5 h	750 mGy
	10 h	1000 mGy
	Temps d'attente post-irradiation du groupe chronique	
	2 jours	4 jours
	8 jours	20 jours
	30 jours	40 jours

2. Prélèvements tissulaires et analyses

A. Prélèvements sanguins et spléniques

Les animaux ont été anesthésiés par injection de ketamine/xylazine (Ketamine 500 Virbac, Rompun 2% Bayer) en intrapéritonéale, puis euthanasiés par dislocation cervicale. Le sang a été récupéré par ponction intracardiaque avec une seringue héparinée. Puis la rate et l'aorte ont été disséquées.

B. Immunophénotypage des populations monocytaires sanguines et des populations lymphocytaires spléniques

Les cellules sanguines ont d'abord été marquées avec un bloqueur des fragments Fc, FcR Blocking Reagent (Mylteni), suivi par un marquage avec les anticorps de surface identifiant les monocytes : **Ly6G** (Gr-1) (FITC, clone 1A8-Ly6g #11-0112), **Ly6C** (APC, clone RB6-8C5, # 17-5931-82), **CD11b** (Efluor450 Clone M1/70 # 48-9668-80, Invitrogen), and **F4/80** (PE #12-4801-82 Invitrogen). Les érythrocytes ont été ensuite lysés avec une solution d'ACK Lysing buffer (#A10492-01, Gibco).

Les cellules de rates ont été broyées, filtrées et incubées avec du FcR Blocking Reagent (Mylteni) suivi par une seconde incubation d'un cocktail d'anticorps composé d'anticorps de surface : **CD3** (AF700 #56-0032-80 Invitrogen), **CD4** (FITC #11-0041-82 Invitrogen), **CD8** (APC #47-0081-80), CD69 (PE #553237 Biolegend), and **CD25** (Efluor450 #45-0251-80). Suivi d'un dernier marquage avec **Foxp3** (APC #17-5773-80 Invitrogen) avec une perméabilisation des cellules avec une solution de Fixperm.

La cytométrie en flux a été réalisée avec une FACS CANTO II, après un gating en forward et en side scatter, les doublets de cellules ont été exclus.

Tableau 12 Sous-type lymphocytaires et monocytaires selon leurs marqueurs de surfaces.

Monocytes (CD11b+Ly6G-)	Ly6C^{High}: CD11b+ly6G-Ly6C⁺⁺ LY6C^{Low}: CD11b+ly6G-Ly6C⁻ Granulocytes: CD11b+Ly6G+
Lymphocytes T	Cellules T reg : CD4+CD8-CD69-CD25 Cellules T CD8+ : CD4-CD8+ Cellules T CD69+ : CD4+CD8-CD69+

C. Prélèvements aortiques et rtPCR

Le cœur et l'aorte sont extraits de l'animal peu après euthanasie. Les aortes sont ensuite baignées dans du Trizol *Tri Reagent solution* (Sigma-Aldrich) afin d'en extraire les ARN totaux. L'ARN est ensuite dosé par un nanodrop ND1000. 1µg d'ARN codant est ensuite utilisé pour synthétiser 20 µl d'ADN complémentaire grâce à un kit de réverse transcription à haute capacité (Life Technologies, Saint Aubin, France). La PCR quantitative en temps réel est ensuite réalisée avec QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies) en utilisant un réactif Taqman et un cycle d'amplification standard (50°C pendant 2 minutes avant le premier cycle, 95°C pendant 15 secondes, et 60°C pendant 1 minute répété 45 fois). Le tableau ci-dessous référence la liste des amorces et leurs propriétés (Tableau 13).

Tableau 13 Liste des amorces.

TGFβ	anti-inflammatoire	Mm01178820_m1
VCAM-1	inflammatoire	Mm00516023_m1+
ICAM-1	inflammatoire	Mm00516023_m1
TNFα	inflammatoire	Mm00443258_m1
Sélectine-E	inflammatoire	Mm0441278_m1
IL-1	inflammatoire	Mm00492638_m1

Un résumé du protocole expérimental est affiché ci-dessous (Figure 31).

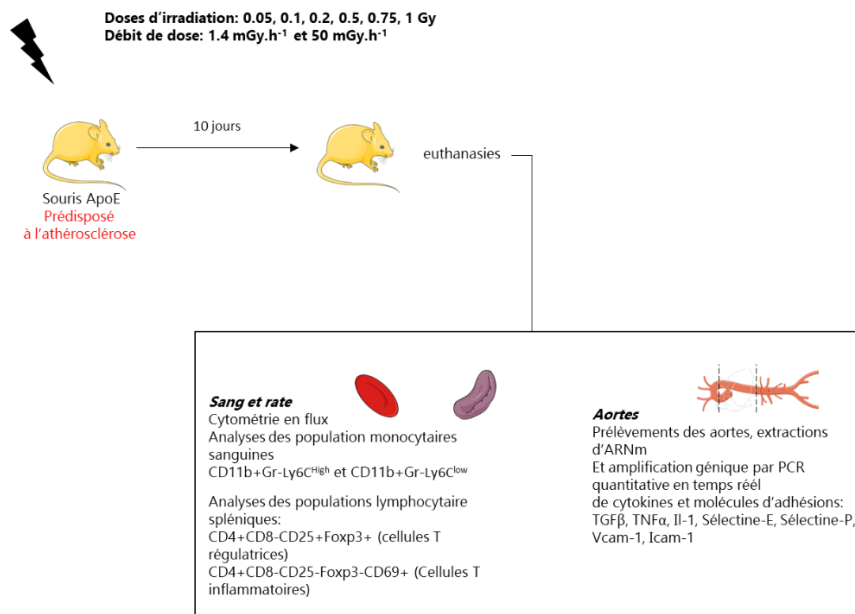


Figure 31 Protocole expérimental d'euthanasie des animaux - récupération de sang par ponction intracardiaque, de la rate et de l'aorte abdominale.

II. Etude des effets des faibles doses de rayonnements ionisants γ sur des modèles murins ApoE^(-/-) prédisposés à l'athérosclérose sur la polarisation des macrophages à court délai post-irradiation et étude des conséquences phénotypiques et immunologiques sur la plaque d'athérosclérose à long terme

1. Animaux et irradiations

Des souris ApoE^(-/-) prédisposées à l'athérosclérose âgées de 14 à 16 semaines ont été irradiées en corps entier à 3 doses d'irradiation (γ): 0.05, 0.5 et 1 Gy avec un unique débit de dose de 10.35 mGy.h⁻¹. Les animaux ont ensuite été laissés au repos pendant soit 24 heures, 10 jours ou 100 jours. Entre 4 et 6 souris ont été utilisés par groupe (Figure 32).

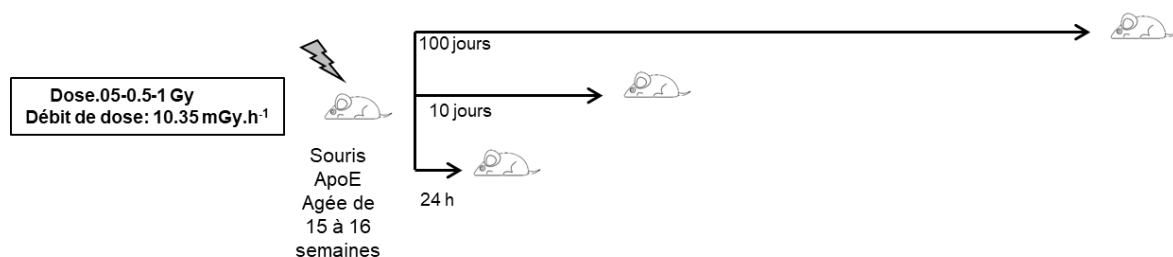


Figure 32 Modalités d'irradiation de l'animale et durée de mise en repos post-irradiation.

2. Protocole de polarisation des macrophages issus de moelle osseuse de souris ApoE^(-/-)

Vingt-quatre heures ou 10 jours après irradiations, les animaux ont été anesthésiés par injection de ketamine/xylazine (Ketamine 500 Virbac, Rompun 2% Bayer) en intrapéritonéale, puis euthanasiés par dislocation cervicale. Les fémurs et tibias ont été isolés en condition stérile, puis les bords sectionnés afin de récupérer les cellules de la moelle pour les placer en culture dans un milieu RPMI 1640 1X (Gibco) avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF Life technologie) et 2% de pénicilline/streptomycine (SIGMA). A ce milieu, 50 ng.ml⁻¹ de Macrophage Colonie Stimulating Factor est ajouté afin de différencier les cellules de moelle osseuse en macrophages. Au bout de 5 jours de culture, les cellules macrophagiques sont polarisées, pour une durée de 24 heures : soit en en macrophage M1 avec l'ajout de 50 ng.ml⁻¹ de INF γ (Peprtech), soit en macrophages M2 avec l'ajout de 10 ng.ml⁻¹ de IL-4 (Peprtech). Les macrophages avec uniquement du M-CSF sont considérés comme des macrophages M0.

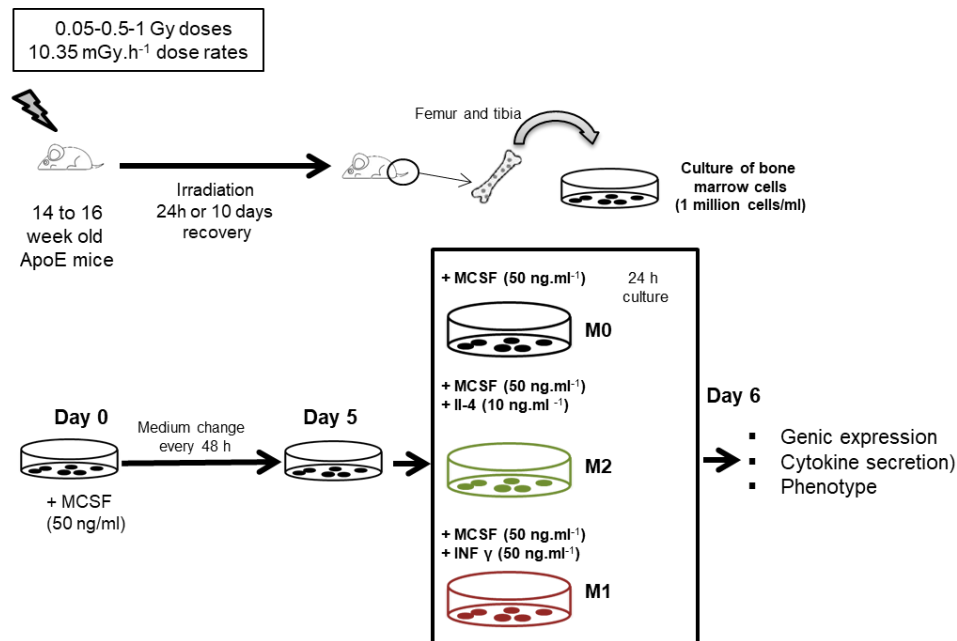


Figure 33 Protocole de mise en culture et de polarisation des macrophages issus de moelle osseuse de souris ApoE^(-/-) exposés à des doses faibles et modérées de rayonnements ionisants.

D. Analyses

i. Etude de l'expression génique

Les cellules ont été baignées dans du Trizol *Tri Reagent solution* (Sigma-Aldrich) afin d'en extraire les ARN totaux. L'ARN est ensuite dosé par un nanodrop ND1000. 1 µg d'ARN codant est ensuite utilisé pour synthétiser 20 µl d'ADN complémentaire grâce à un kit de réverse transcription à haute capacité (Life Technologies, Saint Aubin, France). La PCR quantitative en temps réel est ensuite réalisée avec QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies) en utilisant un réactif Taqman et un cycle d'amplification standard (50°C pendant 2 minutes avant le premier cycle, 95°C pendant 15 secondes, et 60°C pendant 1 minute répété 45 fois). Le tableau ci-dessous référence la liste des amorces et leurs propriétés (Tableau 14).

Tableau 14 Liste des amorces (2).

HPRT	Control	S: TCAGTCAACGGGGACATAAA AS: GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
GAPDH	Control	S: AGGTCGGTGTGAACGGATTG AS: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
β -actine	Control	S: AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG, AS: TCCCTGGAGAAGAGCTACGA
IL-6	Pro-M1	S: CCTTCTGGGACTGATGCTGGTG AS: AGGTCTGTTGGGAGTGGTATCCTC
TNF α	Pro-M1	S: AGCCGATGGGTTGTACCTTG AS: GTGGGTGAGGAGCACGTAGTC
Chil-3	Pro-M2	S: TCTGGGTACAAGATCCCTGAA AS: TCTGGGTACAAGATCCCTGAA
EGR2	Pro-M2	S: CCCTTTGACCAGATGAACGGAG AS: AAGCTACTCGGATACGGGAGATC
Arginase-1	Pro-M2	S: CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG AS: CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG
Retnla	Pro-M2	S: GGAGCTGTATTAGGGACATCA AS: TCCCAAGATCCACAGGCAAA

ii. Analyses des cytokines relarguées dans le milieu

Les surnageants de culture cellulaire de macrophages polarisés ont été récoltés et stockés à -80°C . Les niveaux d'**IL-10** (M1000B), **TGF- β** (MB100B), **TNF- α** (MTA00B), **IL-6** (M6000B) et **IL-1 β /IL-1F2** (MLB00C) ont été déterminés à l'aide de kits ELISA (R&D Systems). Les tests ELISA ont été effectués conformément aux instructions du fabricant. Pour cela, 50 μl de surnageant non dilué ont été incubés dans une plaque plate transparente à 96 puits pré-coaté d'anticorps primaires pendant 2 heures et lavés 4 ou 5 fois avec une solution tampon de lavage. Après incubation, l'anticorps secondaire est ajouté et incubé pendant 2 heures supplémentaires, puis de nouveau nettoyé. Les échantillons sont ensuite révélés au bout de 30 minutes avec 100 μl de tétraméthylbenzidine par puits et la réaction est arrêtée avec 100 μl de solution d'acide chlorhydrique dilué. L'absorbance a été mesurée dans un lecteur de microplaques à 450 nm et une correction pondérale a été appliquée à 540 nm.

iii. Immunophénotypage des macrophages polarisés

Pour la culture de cellules BMDM, les cellules ont été retirées des plaques à 6 puits et placées dans du PBS à 4°C à raison de 1.10^6 cellules par tube et colorées avec un réactif de blocage FcR (# 130-059-901-Mytleni) pendant 15 minutes et marquées avec un mélange de CD11b (PeCy7 clone M1/70 #11-0112-82 Invitrogen), F4-80 (PE clone 30 F11 #12-4801-82 Invitrogen) CD 206 (APC #46879 Invitrogen). Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS contenant 2 % de sérum de veau foetal (SVF). Les échantillons de cellules marquées ont ensuite été conservés dans de la glace froide à l'obscurité jusqu'à

leur passage dans le cytomètre. La fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant FACSCanto II (BD Biosciences) et analysée avec le logiciel Flowjo. Des billes de compensation ont été utilisées pour la compensation des couleurs, et des échantillons FMO ont été utilisés comme contrôle négatif. La fluorescence a été mesurée par cytométrie en utilisant FACSCanto II (BD Biosciences) et analysée avec le logiciel Flowjo. Des billes de compensation ont été utilisées pour la compensation des couleurs, et des échantillons FMO ont été utilisés comme contrôles négatifs.

3. Immunophénotypage des populations monocytaires sanguines et spléniques

L'ensemble des organes collectés (rate et sang) ont été marqués avec un mélange de 6 anticorps de surface CD115 (PE/Cy7 anti clone de souris AF598 Biolegend #135524), CD11b (Efluor450 Clone M1/70 # 48-9668-80, Invitrogen), Ly6C (APC, clone RB6-8C5, # 17-5931-82), Ly6Gr1 (FITC, clone 1A8-Ly6g #11-0112), Cx3CR1 (PerCP/Cy5.5 anti-mouse, clone 5A011F11 #149010 Biolegend), CCR2 (PE #150610, clone 5A203G11 Biolegend).

Les cellules sanguines (1.10^6 cellules) ont été traitées avec le tampon de lyse ACK afin détruire les érythrocytes. Ensuite, elles ont été marquées pendant 15 minutes avec un réactif de blocage du FcR (# 130-059-901- Mylteni) pour éviter un marquage non spécifique.

Pour les cellules de la rate, la rate a été écrasée puis filtrée avec un filtre de $70\mu\text{m}$. Les cellules ont ensuite été collectées, marquées avec un réactif de blocage du FcR. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS après centrifugation (500 g). Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS contenant 2 % de FBS. Les échantillons de cellules marquées ont ensuite été conservés dans de la glace froide à l'obscurité jusqu'à leur passage dans le cytomètre. La fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant FACSCanto II (BD Biosciences) et analysée avec le logiciel Flowjo. Des billes de compensation ont été utilisées pour la compensation des couleurs, et des échantillons FMO ont été utilisés comme contrôles négatifs.

4. Immunomarquages et colorations

Le cœur et l'aorte sont extraits de l'animal peu après euthanasie. Le cœur ainsi qu'une portion de l'aorte sont placés dans des cryo moules et congelés à -80°C dans l'OCT (Optimum Cutting Temperature) en vue de réaliser des colorations et des immunomarquages après coupes de microsections de $7\mu\text{m}$ au cryostat. Les analyses à long terme ont été réalisées 100 jours après irradiations.

A. Colorations

Des cyrosections ont été consacrées aux colorations. Les lipides ont été colorés à l'huile rouge (Oil red O, Sigma), tandis que le collagène a été marqué au rouge Picrosirius (PicroSirius Red, Sigma).

B. Immunomarquages

Pour les tests d'immunomarquage, la contenance des plaques en macrophages a été révélée avec CD68 marqué au PE (Phycoérythrine), les cellules lymphocytaires ont été révélées avec CD3 marqué au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) et les cellules musculaires lisses ont été révélées avec α -SMA marqué au FITC.

Un récapitulatif des expérimentations effectuées sur les animaux irradiés et laissés au repos 100 jours est résumé ici (Figure 34).

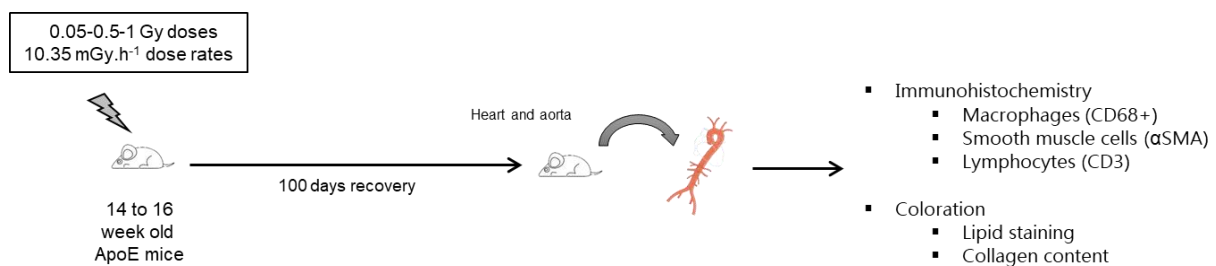


Figure 34 Protocole expérimental à long terme post-irradiation - des cyrosections de sinus aortiques ont été utilisées afin de réaliser des analyses d'immunofluorescence pour quantification de macrophages, lymphocytes T et cellules musculaires lisses. Des colorations à l'huile rouge et au rouge Picrosirius ont également été effectuées afin de quantifier les lésions lipidiques et le collagène au sein des plaques d'athérome.

III. Données complémentaires : études de motilité et transmigration de lignées humaines THP-1 et culture clonale de progéniteurs murins

En complément des études *in vivo*, nous avons étudié la capacité des monocytes à être dirigés par l'intermédiaire de chimiokines *in vitro*. L'objectif de ce travail était de mettre en évidence si les doses faibles et modérées pouvaient modifier l'attraction des monocytes vers un chimio-attractant, à travers d'un insert poreux, ou à travers d'une barrière endothéliale. Ce protocole permettait de mimer la circulation de ces cellules en direction de leur site d'action.

1. Etude de transmigration et motilité cellulaire

A. Culture cellulaire

i. Culture de THP-1

Des lignées de cellules THP-1 (ATCC - TIB 202 THP-1 acute monocytic lineage leukemia human lot n°63558119) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 1X (Gibco) avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF Life technologie) et 2% de pénicilline/streptomycine (SIGMA) afin de prévenir la prolifération de bactéries ou de champignons. La concentration de départ des cellules après décongélation était fixée à 250 000 cellules dans 20 ml de milieu de culture dans des flasques T75. Les flasques de cellules étaient ensuite placées à l'étuve à 37°C et 5% de CO₂.

Un comptage était réalisé tous les deux jours afin de surveiller la concentration et la prolifération cellulaire. Le comptage manuel était réalisé avec une cellule de Malassez avec 50 % de bleu de trypan, un colorant azoïque qui n'est pas relargué par les cellules mortes, permettant de compter uniquement les cellules vivantes. Ce comptage permet de maintenir les cellules à la concentration désirée.

ii. Culture de cellules endothéliales HUVEC

Des cellules immortalisées HUVEC (Human umbilical vein endothelial Cells- EGM-2 #C2517A Lonza) lot n°0000090183) furent décongelées mises en culture dans du milieu EGM-2 à l'étuve à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu est changé toutes les 48 heures et le tapis cellulaire est surveillé afin que les cellules ne dépassent pas 80% de confluence. Lorsque la confluence est quasi atteinte, les cellules étaient décollées à la trypsine et réensemencées dans de nouvelles flasques T75 à 200 000 cellules/ml.

B. Irradiation des lignées

Les flasques T75 contenant les lignées monocytaires THP-1 humaines furent exposés à une source de ^{137}Cs à un débit de dose de $10,85 \text{ mGy}\cdot\text{min}^{-1}$ pour des doses cumulées de : 50, 500 et 1000 mGy. Les flasques non-irradiés faisant office de groupe contrôle. Les flasques ont toutes été égalisées à une concentration de 600 000 cellules/ml avant d'être irradiées.

C. Test de transmigration et motilité

i. Motilité monocyttaire

Afin de mimer la transmigration monocyttaire, des plaques contenant des inserts poreux de $8\mu\text{m}$ de diamètre (Coarning Biocoat- control Inserts $8,0 \mu\text{m}$ PET membrane) ont été utilisées (Figure 35). A cette fin, $700 \mu\text{l}$ de RPMI 1640 avec 0,5% de SVF et $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de MCP-1 (Recombinant Human CCL2/JE/MCP-1 R&D System) agissant comme chimioattractant ont été déposés dans le puits, puis $100 \mu\text{l}$ de milieu RPMI + 0,5% SVF contenant 100 000 cellules THP-1 ont été déposés dans l'insert. Un puits rempli de milieu RPMI 1640 avec 0,5% de SVF sans MCP-1 servait de témoin négatif. Ensuite les comptages des cellules transmigrées au travers de la membrane poreuse jusqu'à dans le puits ont été réalisés après différents temps d'incubation : 3, 6 et 24 heures. De plus, les tests de transmigration des cellules irradiées ont été effectués après différents temps post-irradiations : 1, 3, 7 et 10 jours post irradiation.

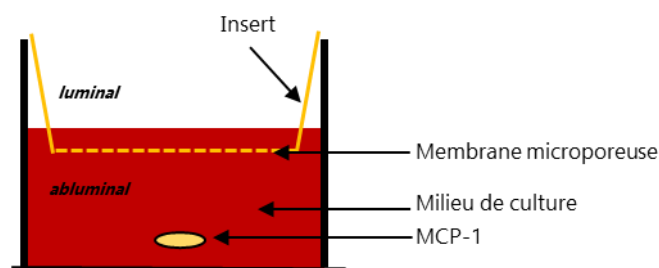


Figure 35 Membrane poreuse pour test de transmigration des THP-1.

Une fois l'incubation terminée, le milieu de part et d'autre de la membrane, en luminal et en abluminal, est collecté puis le nombre total de cellules est compté à la cellule de malassez. La répartition des cellules en fonction de la dose totale exposée est indiquée ci-dessous (Figure 36).

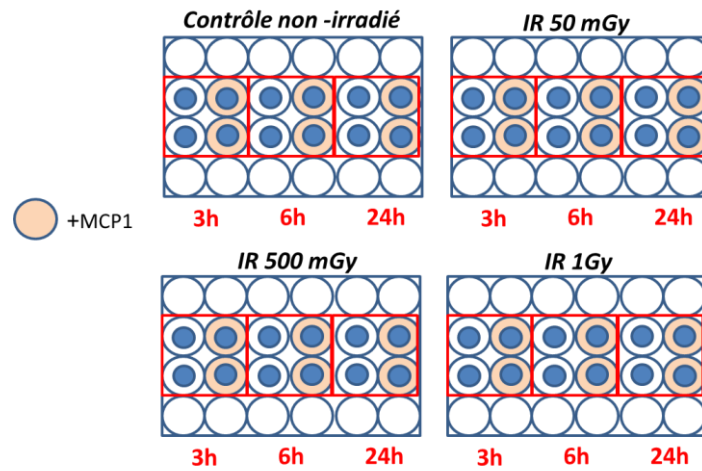


Figure 36 Répartition des cellules au sein des plaques Corning selon le temps d'incubation et la dose d'irradiation.

ii. Transmigration monocyttaire

Le principe du test de motilité monocyttaire est quasiment identique au test de transmigration indiqué précédemment. Cependant, des cellules endothéliales HUVEC tapissent la membrane poreuse afin de mimer le tapis endothélial. La concentration de THP-1 et les volumes de milieu sont identiques au protocole précédent, néanmoins 100 μl de cellules Huvec à une concentration de 560 000 cellules. ml^{-1} sont déposés 24 heures avant le dépôt des THP-1 dans l'insert.

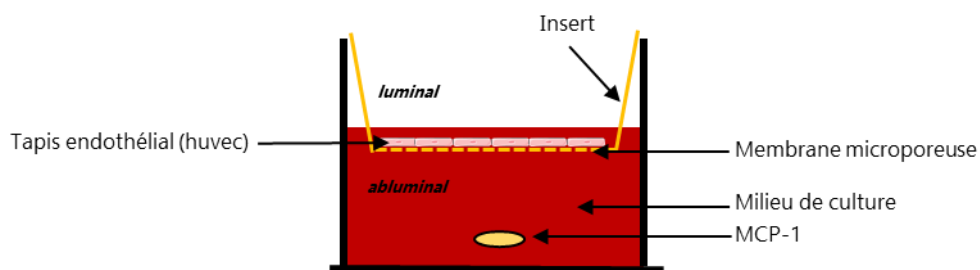


Figure 37 Schéma de membrane poreuse accompagné d'un tapis endothélial de cellules Huvec.

Une fois l'incubation terminée, le milieu de part et d'autre de la membrane, en luminal et en abluminal, est récupéré puis le nombre total de cellules est compté à la cellule de malassez.

2. Culture clonale de progéniteurs murins

Les comptages d'unité formant des colonies (CFU) permettent de mesurer la prolifération et la capacité de différenciation d'une cellule individuelle. Cet essai permet de visualiser les colonies produites par chaque cellule progénitrice. Nous avons réalisé les tests CFU chez des souris prédisposées à l'athérosclérose afin de mesurer l'impact éventuel de l'irradiation à dose faible sur la prolifération des progéniteurs myéloïdes.

A. Animaux et irradiations

Des souris ApoE^(-/-) furent utilisées pour ces expérimentations. Ces animaux âgés de 14 à 16 semaines furent irradiés aux rayons γ par exposition avec une source externe de ¹³⁷Cs pour des doses cumulées de 0.05, 0.5 et 1 Gy avec un débit de dose fixé à 10,85 mGy.min⁻¹.

B. Mise en culture des progéniteurs hématopoïétiques

Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de Kétamine/Xylazine (Ketamine 500 Virbac, Rompun 2% Bayer) puis euthanasiés par dislocation cervicale. Les fémurs et tibias ont ensuite été isolés, puis les extrémités des os ont été sectionnés afin d'extraire la moelle osseuse en y introduisant une aiguille stérile 25-G contenant du milieu de culture (RPMI 1640 1X (Gibco) + 10 % de SVF) permettant l'évacuation des cellules de la moelle. Les cellules sont ensuite filtrées avec un filtre de 70 μ m, centrifugées et comptées à la cellule de mallassez afin d'obtenir une concentration à 250 000 cellules par ml. Les cellules sont ensuite diluées au 1/10 dans du milieu MethoCult™ GF M3434 (STEMCELL). Un volume de 1,1 ml de nouveau milieu [25 000 cellules.ml⁻¹] est ensuite délicatement déposé dans une boîte de pétri 35 mm puis placé l'étuve à 37°C et 5% de CO₂. L'ensemble de la procédure est réalisé dans des conditions stériles et les cultures de colonies sont laissées 11 jours en incubation sans changement de milieu.

C. Comptage des colonies

Après 11 jours d'incubation les colonies de chaque type sont identifiées et comptabilisées au microscope. Trois types de colonies ont été distingués dans cette étude : les CFU-M, à l'origine des monocytes et macrophages les CFU-G, à l'origine des granulocytes les CFU-GM à l'origine des CFU-M et CFU-G. Des exemples de colonies sont présentés ci-dessous (Figure 38):

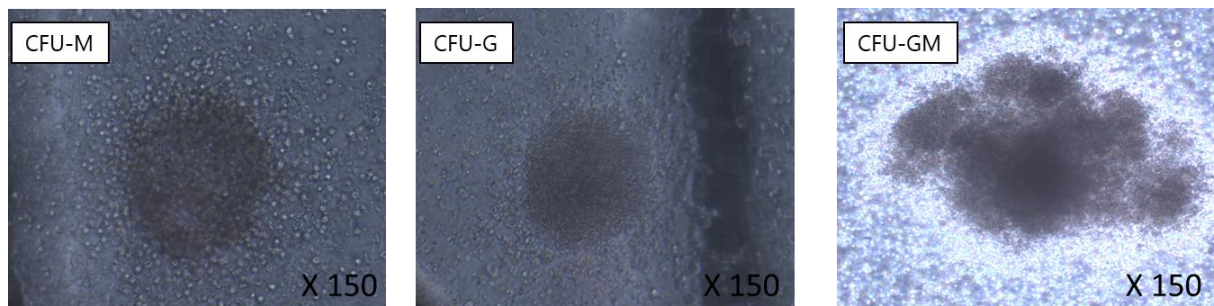


Figure 38 Exemple d'unités de formations de colonies : CF-M, CFU-G, CFU-GM.

Résultats

RESULTATS

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

Nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus par les études *in vivo*, cette partie sera constituée de deux sous-parties correspondant aux articles scientifiques qui ont été soumis ou qui sont en cours d'écriture.

La seconde partie abordera quant à elle les résultats complémentaires obtenus par des expérimentations *in vitro* sur des lignées myéloïdes après exposition à des doses faibles à modérées de rayonnements ionisants.

RESULTATS *IN VIVO*

I. Résultats (1)

Etude des effets à doses faibles et modérées de rayonnements γ sur des modèles murins ApoE^(-/-) prédisposés à l'athérosclérose : immunophénotypage des populations monocytaires sanguines et lymphocytaires spléniques et étude de l'expression génique en molécules d'adhésion et de cytokines aortiques

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence les effets engendrés par une exposition à une gamme de doses faibles à modérées de rayonnements ionisants avec deux débits doses, l'un aiguë et l'autre chronique dans un modèle murin de prédisposition à l'athérosclérose.

Des souris ApoE^(-/-) ont été exposées à des doses faibles et modérées de rayonnements ionisants γ à débit de doses faible et élevé. Nous avons mis en évidence que les populations monocytaires sanguines Ly6C^{High} étaient diminuées à l'ensemble des doses d'exposition. Aux doses les plus faibles ; nous observons également une diminution dans la proportion des populations inflammatoires de cellules T CD69+ dans la rate à faible débit de dose, ainsi qu'une diminution de l'expression génique en molécule d'adhésion VCAM-1 et Sélectine-1 et en cytokine IL-1.

Ces résultats mettent en avant une réponse à faibles doses qui est non linéaire et dépendante du type cellulaire. Ces travaux apportent des éléments supplémentaires dans la compréhension de l'impact des faibles doses de rayonnements à différents débits de dose sur la réponse du système immunitaire dans le contexte de l'athérosclérose.

Ces résultats ont fait l'objet d'une soumission dans la revue « Dose-Response »

Exposure to low to moderate doses of ionizing radiation induces a reduction of pro-inflammatory Ly6C^{high} monocytes and a U-curved response of T cells in ApoE^(-/-) mice.

¹N. Rey, ²T. Ebrahimian, ¹C. Gloaguen, ¹D. Kereselidze, ¹V. Magneron, ¹A. Bontemps, ¹C. Demarquay, ³G. Olsson ³S. Haghdooost, ²S. Lehoux, ¹T.G. Ebrahimian.

1. Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, laboratoire de radiotoxicologie et de radiobiologie expérimentale, 92260, Fontenay-aux Roses-France.
2. McGill University, Division of Experimental Medicine, Montreal, Canada.
3. Centre for Radiation Protection Research, Department Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, 106 91 Stockholm, Sweden.

Corresponding Author

Dr. Teni Ebrahimian

Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, laboratoire de radiotoxicologie et de radiobiologie expérimentale

31 Avenue de la division Leclerc

92262, Fontenay-aux Roses, France

Phone : +33(1)58357007

E-mail : teni.ebrahimian@irsn.fr

Abstract

The response of low dose ionizing radiation on cardiovascular disease has a much-nuanced answer than the response after exposure to high doses such as seen in cohort studies of radiotherapy. We investigated the effects of low dose ionizing radiation in immunomodulatory response at different dose and dose-rate on ApoE^{-/-} mice predisposed to atherosclerosis. Mice were exposed to external γ ray at low dose rate (1.4 mGy.h⁻¹) and high dose rate (50 mGy.h⁻¹) with cumulative doses reaching 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75 and 1 Gy. Monocytes and T cells proportions were quantified in blood and spleen respectively using flow cytometry and aortas were used in order to evaluate gene expression of adhesion molecules and cytokines. We found that irradiation led to a significant decrease in pro-inflammatory monocyte in blood significant at all cumulative dose range in mice predisposed to atherosclerosis especially at high dose rate. On the other hand, T lymphocytes in spleen seem to follow a threshold pattern, with a decrease in activated pro-inflammatory CD69+ cells at 0.1 Gy followed by a normalization and a tendency to increase at higher doses. We also found that expression of adhesion molecules VCAM-1, and Selectin-1 as well as IL-1 expression were reduced at 0.2 Gy dose. These results suggest that in the myeloid line, an anti-inflammatory response seems to be translated by a decrease in pro-inflammatory Ly6C^{High} monocytes, in opposition T lymphocytes in spleen follow a U-curved response after exposure to LDIR at low dose-rate. Response to irradiation were nonlinear in all cases and cell-type dependent. This work brings additional element for the understanding of the impact of LDIR at different dose-rates on the immune system response in the context of atherosclerosis.

Introduction

Different studies covering the impact of ionizing radiation on cardiovascular disease have been conducted, and there are still interrogations remaining about the impact of such exposure. It is common knowledge thanks to both epidemiological studies (Mulrooney et al. 2016; Boivin et al. 1992; McGale et al. 2011; Shimizu et al. 2010) and experimental studies (Bashar et al. 2014; Hoving et al. 2008) that exposure to high doses of ionizing radiation have detrimental effect on cardiovascular functions. Whereas epidemiological studies concerning low dose ionizing radiation (LDIR) could not overall provide clear elements about the impact of such exposure on atherosclerosis. For instance, Schöllnberger et al (Schöllnberger et al. 2018) do not answer whether there is a risk of heart disease for doses below 2.6 Gy, and Azizova et al (Azizova et al. 2010) showed an increased risk of developing ischemic heart disease for cumulative external doses above 1 Gy. There is still an ongoing lack of epidemiological data on the impact of radiation on cardiovascular diseases after exposure to low to moderate doses especially under 500 mGy (Baselet et al. 2016).

Many cardiovascular diseases are consequential of atherosclerosis, an arterial disease characterized by chronic and exacerbated inflammation in the wall of medium and large vessels. Experimental studies investigating the effects of radiation on atherosclerosis have been conducted mainly on mouse models, using genetically modified ApoE^(-/-) mice. All the experiments have shown the importance of the dose-rate in this context. Indeed, Mitchel et al (Mitchel et al. 2011b) demonstrated that exposure to LDIR especially at low dose rate had protective effects on cardiovascular disease by slowing its progression. Mancuso et al. (Mancuso, Pasquali, Braga-Tanaka, et al. 2015) showed that exposure to moderate doses (300 mGy) can have detrimental effects on cardiovascular system only after acute exposure, but they also measured a decrease in plaque density with chronic exposure. Also, Le Gallic et al. (Le Gallic et al. 2015) found that exposure to chronic internal LDIR enhances plaque stability of ApoE^(-/-) mice. All studies showed a nonlinear response with a decrease in pro-inflammatory parameters after exposure to low dose LDIR, corroborating the idea that ionizing radiation has an impact in the immune system and could modulate inflammation. This must be put into the perspective that radiation is known to have an impact on immune response, not only because of DNA damage in cells and apoptosis, but also because of mechanisms such as abscopal or bystander effects (Hildebrandt 2010; Mothersill et Seymour 2006). Immune response to ionizing radiation will highly depend on radiation dose and on the specific targeted cells. High doses of ionizing radiation promote inflammation (Williams et al. 2003) whereas exposure to lower doses lead to a decrease inflammation (Seegenschmiedt et al. 2008; Rodel et al. 2012).

Cell components of both innate and adaptive immunity are involved in atherosclerosis. These cells originate in the bone marrow and are released in the circulation, from which they will migrate into tissues following chemotactic gradients, or transfer into lymphoid tissue such as the spleen for further maturation. The atherosclerotic plaque is formed after entry of low-density lipoproteins in the intimal layer of arteries. There, oxidative changes of lipoproteins trigger the inflammatory response, favoring recruitment of circulating monocytes, innate immune cells that penetrate the endothelial layer. Monocytes can transmigrate through the endothelium thanks to adhesion molecules expressed by the endothelial cells: intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1), and E-Selectin (E-Sel). As monocytes accumulate, there is an alteration of the artery wall structure, and

an enhanced recruitment of further inflammatory cells (Virmani et al. 2005; Moulton et al. 2003; Newby 2005; Fuster et al. 2005; Virmani et al. 2005). In mice, circulating blood monocytes can be divided in two subsets. On the one hand Ly6C^{High} monocytes are considered to be pro-inflammatory (Woollard et Geissmann 2010). They facilitate atherosclerosis development by virtue of their ability to differentiate into M1 macrophages (Rahman et Woollard 2017). They produce pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , or interferon gamma (IFN- γ). On the other hand, Ly6C^{Low} monocytes are also named "patrolling" monocytes thanks to their ability to monitor the vasculature. They can infiltrate into tissue, and tend to differentiate into alternate M2-macrophages that are involved in wound repair and tissue remodeling (Auffray et al. 2007; Brunet et al. 2016). In vitro exposure of monocytes to high doses of ionizing radiation favors a pro-inflammatory phenotype (Teresa Pinto et al. 2016), whereas LDIR has the opposite effect (El-Saghire et al. 2013; Frischholz et al. 2013; Tsukimoto et al. 2009).

A second set of major actors in atherosclerosis are T lymphocytes, from the adaptive immune system. Specific CD4⁺ effector T cells can recognize oxidized LDL in the atherosclerotic intima and contribute to the inflammatory response that aggravates the disease by producing IFN- γ (Zhou et al. 2000). However, other specific regulatory T lymphocytes (Treg) defined as CD25⁺CD4⁺Foxp3⁺ have the ability to modulate atherosclerosis (Klingenberg et al. 2013) thanks to their production of anti-inflammatory cytokines IL-10 and transforming growth factor beta (TGF β) (Robertson et al. 2003). Remarkably, Tregs appear to be the lymphocyte subtype most resistant to irradiation. In the murine TRAMP C1 model of prostate cancer, Tregs are increased after exposure to radiation (Kachikwu et al. 2011). Thus, the balance between inflammatory effector T cells and anti-inflammatory regulatory T cells will influence atherosclerosis progression or regression (Tabas et Lichtman 2017).

Identifying the mechanisms which modulate inflammation in atherosclerosis at different doses and dose-rates of irradiation is clearly essential. In order to investigate this mechanism, ApoE^(-/-) mice were irradiated at two different dose rate (50 mGy.h⁻¹ and 1,4 mGy.h⁻¹) and a wide range of cumulative doses ranging from 50 mGy to 1000 mGy. Immunophenotyping of immune T cells in the spleen and monocyte subsets in circulating blood were explored and genic expression of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules of aortas were evaluated.

Method

Animals

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) and the Swedish Board of Agriculture (Permit Number N 134/16). Six to 8 weeks-old ApoE^(-/-) male mice on a C57BL/6 background were obtained from Charles River Laboratory. 6-8 mice per group were used. 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. ApoE^(-/-) mice develop atherosclerosis even when fed with chow diet. The morphological features of early-stage lesions in ApoE^(-/-) mice are very similar to those found in humans (Joven et al. 2007). Animals were maintained in a specific-pathogen-free environment and monitored daily.

Irradiation

Mice were distributed into 7 groups according to total cumulative doses of γ rays (137Cs); 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1 Gy (n= 6 each), and a control non-irradiated group (n=8). Two dose rates were applied; very low dose rate at 1, 4 mGy.h⁻¹ for chronic exposure and 50 mGy.h⁻¹ for acute exposure at the Department of Molecular Biosciences, Experimental Animal Core Facility, Stockholm University, Sweden. Mouse groups exposed to the same dose were sacrificed at the same age. (Online Figure 1).

Blood sampling and analyses

Mice were terminally anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (Ketamine 500 Virbac, Rompun 2% Bayer). Blood was collected by cardiac puncture with a heparinized syringe. Blood was centrifuged 10 minutes at 1000g. Spleens were collected in FACS buffer (PBS1X-FBS 2%), whereas aortas were collected in Trizol.

Flow cytometry

Total blood and spleens were collected for flow cytometry experiments. Spleens were mashed, filtered and incubated with Fc blocker (# 130-059-901- Mylteni) followed with a second incubation in a cocktail of cell surface antibodies: CD3 (AF700 #56-0032-80 Invitrogen), CD4 (FITC #11-0041-82 Invitrogen), CD8 (APC #47-0081-80), CD69 (PE #553237 Biolegend), and CD25 (Efluor450 #45-0251-80). FoxP3 (APC #17-5773-80 Invitrogen) labeling was performed upon permeabilization with a 30% Fixperm Solution. Blood was incubated first with FcR blocking reagent (# 130-059-901- Mylteni) followed by cell surface antibodies identifying monocytes: Ly6G (Gr-1) (FITC, clone 1A8-Ly6g #11-0112), Ly6C (APC, clone RB6-8C5, # 17-5931-82), CD11b (Efluor450 Clone M1/70 # 48-9668-80, Invitrogen), and F4/80 (PE #12-4801-82 Invitrogen). Red blood cells were depleted using ACK Lysing buffer (#A10492-01, Gibco).

Flow cytometry was performed on a FACS CANTO II. After forward and side scatter gating, doublets were eliminated. CD11b⁺ monocytes were selected after exclusion of Ly6G positive cells, for identification of Ly6C⁺ and Ly6C⁻ monocytes (Online Figure 2). Flow cytometry was performed on a FACS CANTO II. After

forward and side scatter gating, doublets were eliminated. CD11b+ monocytes were selected after exclusion of Ly6G positive cells, for identification of Ly6C+ and Ly6C-monocytes.

Real Time-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from aortas using Tri Reagent solution (Sigma-Aldrich LLC, St Louis, Missouri). RNA quality (260/280 nm) was determined using a Nanodrop ND 1000 spectrophotometer. One microgram of total RNA was synthesized to 20 μ L complementary DNA (cDNA) using the high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit from Applied Biosystems (Life Technologies, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's protocol. Quantitative polymerase chain reaction analysis was performed with a QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies) using TaqMan 6 carboxyfluorescein-labeled probes and a standard thermal cycler protocol (50°C for 2 minutes before the first cycle, 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute repeated 45 times). Samples were run in duplicates and normalized with gapdh and hprt using geometric mean using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, control samples serving as a reference value of 1. List of primers: TGF β Mm01178820_m1, ICAM-1 Mm00516023_m1, TNF α Mm00443258_m1, E-Selectin-Mm0441278_m1, IL-1rap-Mm00492638_m1, and VCAM-1- Mm01320970-m1.

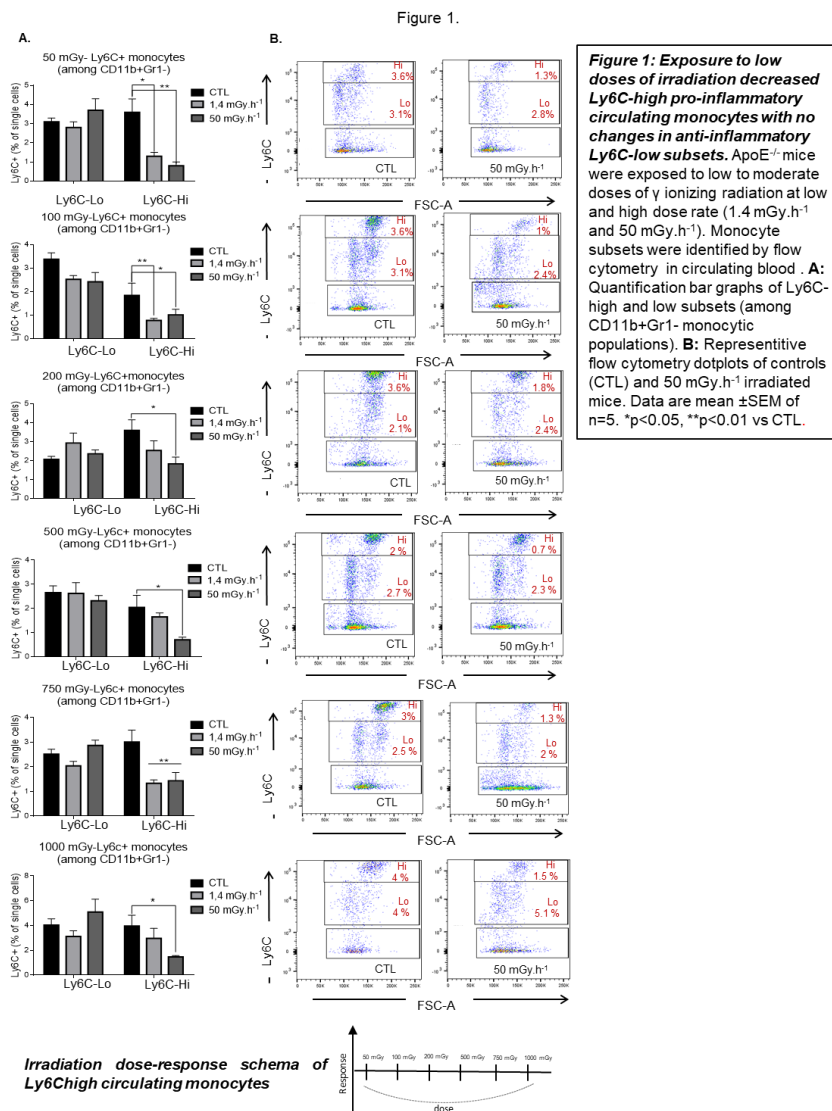
Statistics

Results are presented as mean \pm SEM. Data were compared with two-way analysis of variance (ANOVA) or two-way ANOVA for repeated measures, with all ANOVA tests followed by a Student–Newman–Keuls posthoc test, or with an unpaired t-test, as appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Low and moderate doses of ionizing radiation at low or high dose rate decrease pro-inflammatory Ly6C^{high} monocytes in the blood

Flow cytometry analysis of blood samples provided an overview of circulating monocyte response to irradiation. Ly6C^{High} monocytes are dominant in an inflammatory response and are often named "inflammatory monocytes" and accumulate in atherosclerotic plaque in opposition of Ly6C^{Low} monocytes (Tacke et al. 2007). We observed that exposure to low to moderate doses of external Gamma rays induced a significant reduction in the proportion of Ly6C^{High} pro-inflammatory monocytes in the blood especially when administered at high dose rate. The 50 mGy.h⁻¹ dose rate led to a clear decrease on every dose tested, and significant reductions were seen at 1.4 mGy.h⁻¹ with most doses. This contrasts with Ly6C^{Low} "patrolling" monocytes, whose proportions in blood were not affected by irradiation, whatever the dose or dose rate applied (Fig.1).



Low doses of ionizing radiation affect inflammatory T cells population in a dose-dependent manner.

We compared the effects of different irradiation regimens on CD4+ T cells, either regulatory (CD25+Foxp3+) or effector (CD25-Foxp3-). Treg cells were not impacted by irradiation at any dose tested, and no difference were detected in terms of dose rate for these cell subtypes (Fig.2-A). In contrast, we found that exposure to LDIR at low doses (100 mGy) and at low dose rate induced a decrease in CD69+, activated pro-inflammatory T cells in ApoE^{-/-} mice, with a highest Teff/Treg ratio of 113 % when comparing 0.1 Gy low dose rate to control (Fig.2-C).

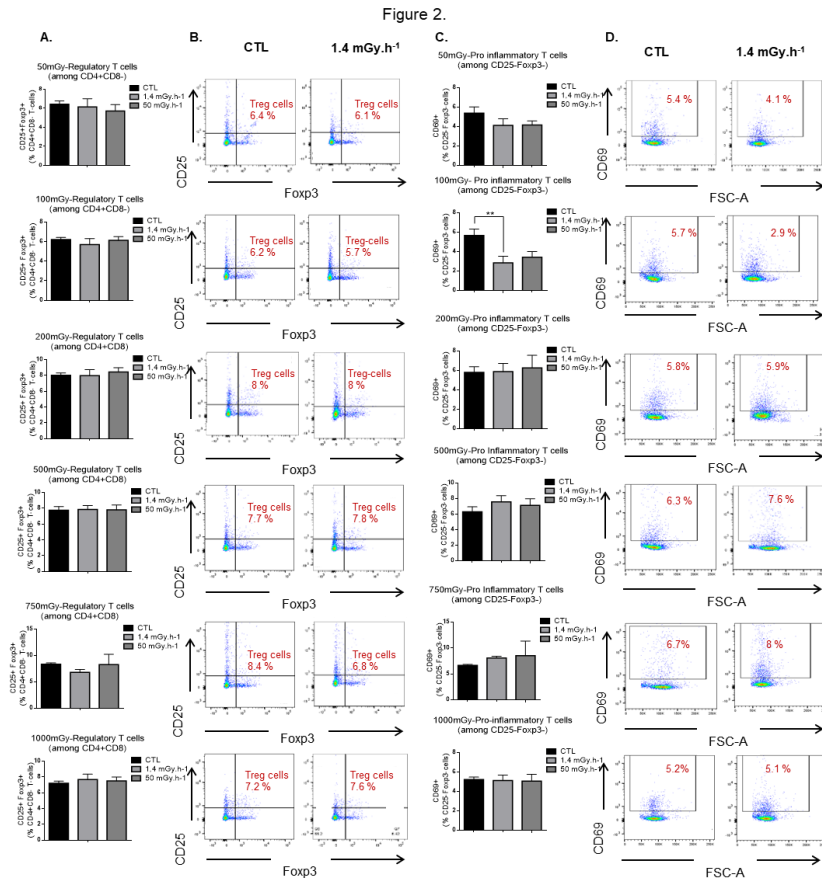
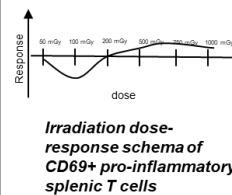


Figure 2: Exposure to low doses of ionizing radiation leads to a decrease in pro-inflammatory CD69+ T-cells at 50 and 100 mGy. ApoE^{-/-} mice were exposed to low to moderate doses of γ ionizing radiation at low and high dose rates (1.4 mGy.h⁻¹ and 50 mGy.h⁻¹). Percentage of splenic Regulatory T cells (T-Regs) and pro-inflammatory T-cells upon exposure to 50 to 1000 mGy of γ rays TBI. **A:** Quantification bar graphs of CD25+Foxp3+ T-regs (among CD4+CD8- lymphocytes). **B:** Representative flow cytometry dotplots of control (CTL) and 50 mGy.h⁻¹ irradiated mice. **C:** Quantification bar graphs of CD69+ T-cell subsets (among CD4+CD8- lymphocytes) **D:** Representative flow cytometry dotplots of control (CTL) and 50 mGy.h⁻¹ irradiated mice. Data are mean \pm SEM of n=5. *p<0.05, **p<0.01 vs CTL.



LDIR induces a nonlinear response on mRNA expression of cytokines and adhesion molecules in aortas of ApoE^{-/-} mice

Adhesion molecules, chemokines and cytokines have a direct impact in the ability of monocytes to be recruited to the vessel wall, to adhere and transmigrate through the endothelial layer, and to differentiate in inflammatory type macrophages. Their relative expression in aortas of ApoE^{-/-} mice were investigated. No effects were detected at the lowest and highest dose 0.05 Gy and at 1 Gy. The intermediate at 0.2 Gy led to significant impact in gene expression. Indeed Adhesion molecules were most impacted at this dose, VCAM-1 was significantly decrease at both dose rate. Concerning cytokine response, we have noticed a significant downregulation by a 0.6 and 0.5 fold for TGFβ at 0.2 Gy at both low (p= 0.022) (Fig.3A) and high dose rate (p=0.04) (Fig.3B) compared to control. IL-1 was also significantly downregulated by half at 50 mGy.h⁻¹ (p=0.005). For adhesion molecules, at 0.2 Gy, VCAM-1 was down regulated by 50 percent with low (p=0.04) (Fig.3A) and high (p=0.02) dose rate (Fig.3A). We also found a downregulation of Selectin-1 by 50 % (p=0.02). This type of response to irradiation in gene expression is non-linear.

Figure 3.

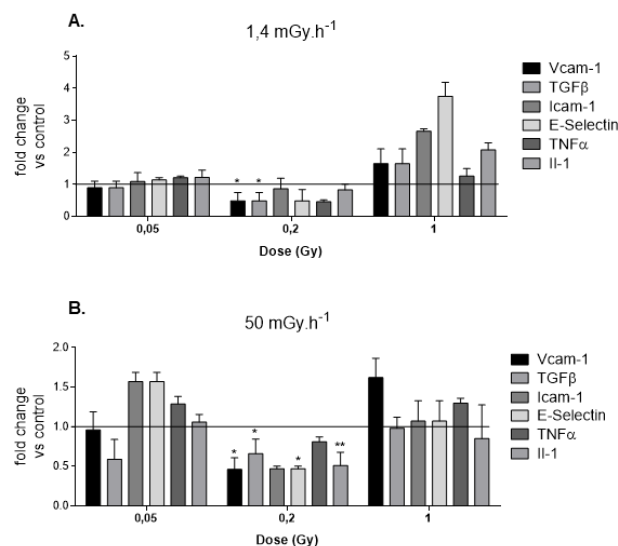


Figure 3: Exposure to low doses of ionizing radiation triggers a non linear-reponse in adhesion molecules and cytokine profile in aortas of ApoE^{-/-} mice. ApoE^{-/-} mice were exposed to low to moderate doses of γ ionizing radiation at low (1.4 mGy.h⁻¹ (A)) and high dose (50 mGy.h⁻¹ (B)) rates. Q-PCR was performed to detect aortic mRNA expression levels of indicated genes. Samples were run in duplicates and normalized with gapdh and hprt using geometric mean using 2^{-ΔΔCT} method, results are expressed as fold change vs non-irradiated control mice. Data are mean ±SEM of n= 5 to 8 animals. *p<0.05, **p<0.01 vs CTL.

Discussion

In this study we show that the immune response to low and moderate dose-range irradiation is different on each immune cell population, in the context of atherosclerosis. Short-term post ionizing radiation shows that high dose-rate has more significant effect on the cells when compared to low dose rate. Moreover, the decrease in both pro-inflammatory monocytes and T cells only with low dose range and low dose-rate suggest the important role of these 2 cell types in atherosclerosis protection in different studies.

Classical Ly6C^{High} monocytes play an important role in the initiation of atherosclerosis. Notably with their known ability to penetrate the endothelial layer and for being precursors of tissue resident macrophages. ApoE^(-/-) mice are prone to developing atherosclerosis and through hypercholesterolemia tend to have a higher concentration in Ly6C^{High} monocytes in blood (Swirski et al. 2007). In our case, the results obtained with flow cytometry on these cell types upon irradiation showed a clear decrease in Ly6C^{High} monocytes in ApoE^(-/-) mouse model. These mice are prone to have a higher-inflammatory background as compared to C57/Bl6 wild type animals due to the presence of a chronic inflammation caused by atherosclerosis, LDIR seem to induce a decrease in pro-inflammatory Ly6C^{High} cells. It has been previously observed (Lall, Ganapathy et al. 2014) that in an auto-immune background, LDIR tends to inverse pro-inflammatory parameters. In addition, Sharma et al (Sharma et al. 2019) demonstrated that LDIR decreased the monocytes count in blood of rats, however they did not specify which monocyte subtype. It is interesting to point out the difference in response to irradiation between monocytes subsets. In ApoE^(-/-) mice, Ly6C^{High} pro-inflammatory monocytes were significantly decreased at almost all applied doses whereas Ly6C^{Low} anti-inflammatory monocytes were not impacted by irradiation.

Regarding T cell populations, different studies in the literature reported that LDIR could have different impact on these cells, with for example an enhancement of CD4+ T cells (S. Liu et al. 1994; Pandey et al. 2005; Ishii et al. 1995; S. Liu, Han, et Liu 1994; Song et al. 2015). Our results suggest that activated pro-inflammatory T cell populations determined as (CD4+CD8- CD25-CD69+) follow a U-curved pattern with a reduction at low dose (0.05 and 0.1 Gy) and an increased shift at 0.75 Gy. It has been reported that Treg cells were decreased in rodents after exposure to such low dose of ionizing radiation leading to an anti-tumor and rather pro-inflammatory activity (Wang et al. 2014; R. Liu et al. 2010). In contrast, (Nakatsukasa et al. 2010) found that Treg cells were significantly increased in mice affected with arthritis. In our study we have not observed such effects on "patrolling" Treg cells.

A similar profile appears in aortic pro-inflammatory genic expression. Indeed, our experiments showed a generally low expression levels of TGF β , E-Selectin, IL-1 and Vcam-1 at 0.2 Gy of cumulated dose. Shin and coauthors (Shin et al. 2010) found a similar decrease in cytokine profile in the serum of C57/Bl6 irradiated-mice with the same dose and similarly this response was inverted at 1Gy. This nonlinear response is in agreement with previous in vitro studies on genic expression in endothelial cells exposed to LDIR (Schröder et al. 2019). VCAM-1 and E-selectin allow firm adhesion of monocytes to endothelial cells leading to their transmigration (Ley et al. 2007). As a consequence, increase expression of VCAM-1 and E-selectin by endothelial cells contributes to atherosclerosis (Ting et al. 2007; Nageh et al. 1997). The low expression of adhesion molecules observed in our study with 0.2 Gy could be an indication of atherosclerosis regression. Furthermore, IL-1 reduction observed at 0.2 Gy is another element in favor of atherosclerosis regression, since IL-1 is a pro-inflammatory cytokine involved in the upregulation of

adhesion molecules on endothelial cell surface (Kirii et al. 2003) and is associated with atherosclerosis progression (Kamari et al. 2011; Kirii et al. 2003; Freigang et al. 2013). However, the downregulation of TGF β expression, an anti-inflammatory and anti-atherogenic cytokine (Lutgens et Daemen 2001) is a contradictory result, that needs further investigations.

Dose rate seems to be an important element in genic expression, and monocyte response to irradiation. The decrease of Ly6C^{High} monocytes was mostly observed at 50 mGy.h⁻¹ suggesting that low dose irradiation with high dose rate induces a more important reduction in pro-inflammatory response than low dose rate. Also, higher variations in genic expression were observed at high dose rate suggesting that higher dose rate is more efficient in mitigating parameters linked to inflammation in ApoE^(-/-) mouse model. In vitro results (Roedel et al. 2002) showed a decrease inflammation with tremendously higher dose rate (1.15 Gy.min⁻¹). To the best of our knowledge the dose rate used in our study has been used in atherosclerosis models only in the works of Mancuso and Mitchel et al (Mancuso, Pasquali, Braga-Tanaka III, et al. 2015; Mitchel et al. 2011a). However, these studies focused on phenotypical changes in plaque such as macrophage presence and lesion associated lipid macrophages. However, these studies focused on phenotypical changes within the plaque such as macrophage content and lesion associated foamy macrophages.

Investigations of different monocyte and lymphocyte subsets regulated by radiations could bring a better understanding of immune response in the context of atherosclerosis. This study show clearly that low dose ionizing radiation have different effects on different cell populations.

Considering the results obtained with monocyte and lymphocyte populations as well as adhesion molecules and cytokine expression in the aorta, it is important to point out that changes observed here are at relatively short-term post irradiation (10 days). Thus, changes in monocyte and lymphocyte behavior were expected, without any phenotypical impact on the atherosclerotic plaque. Phenotypical changes could occur at a longer time point post-radiation. Mitchel et al (Mitchel et al. 2011b) observed modifications in lesions several months after radiation. However, in this study we used a wide range of doses providing specific answers regarding the effects of low and moderate doses of ionizing radiation on immune system.

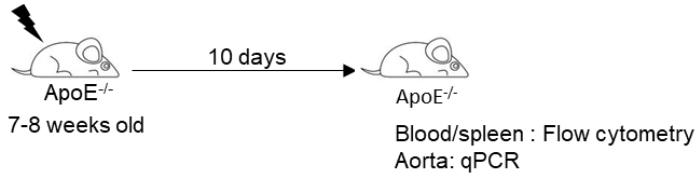
Our results suggest that exposure of ApoE^(-/-) mice to low dose ionizing radiation results in a nonlinear response of immune cells. Exposure to 0.1 to 0.2 Gy doses induce an anti-inflammatory response with a reduction of pro-inflammatory blood Ly6C^{High} monocytes, splenic effector CD69+ T cells and aortic adhesion molecules and cytokines. These observations are in line with the atheroprotective effect of low dose ionizing radiation observed in previous studies (Le Gallic et al. 2015; Ebrahimian et al. 2017; Mitchel et al. 2011a; Mancuso, Pasquali, Braga-Tanaka III, et al. 2015).

Acknowledgement.

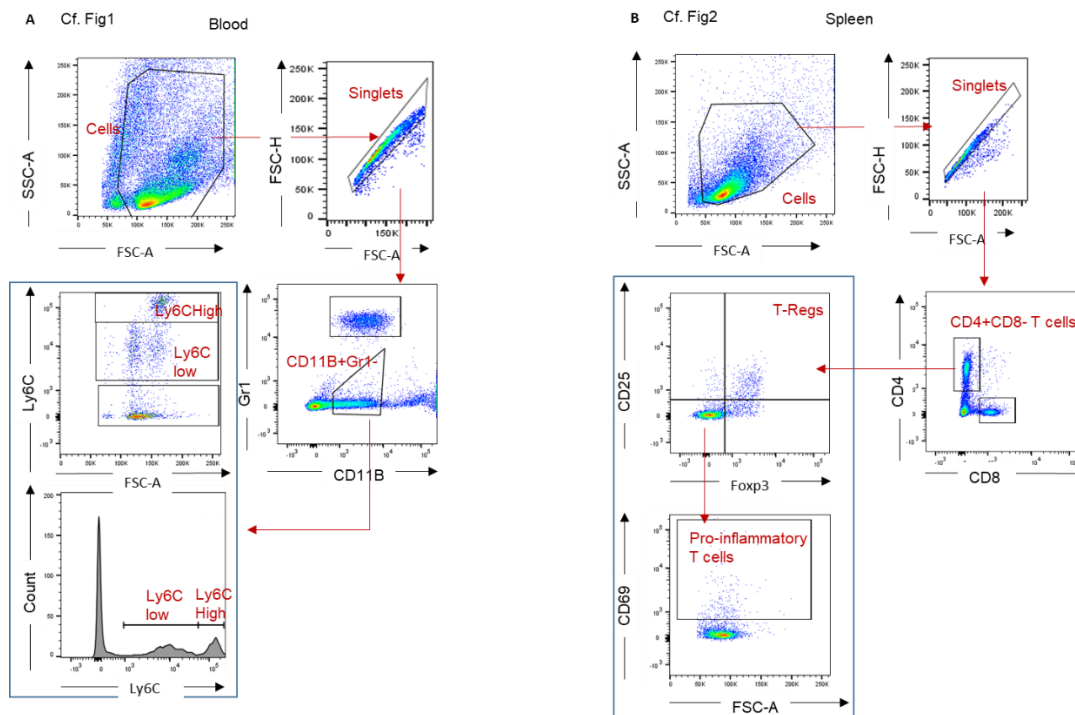
The authors wish to thank D. Klokov for his support as a laboratory head and his proofreading. D.Denis, Sebastien, Granger R, Sache S for experimental care. This work was supported by grants from electricité de France (EDF) to B. Leguen and from the Canadian Institutes of Health Research to S Lehoux.

Appendices

0.05-0.1-0.2-0.5-0.75-1 Gy doses
at 1.4 or 50 mGy.h⁻¹ dose rates



Online Figure 1: Outline of the irradiation protocol. 7-8 weeks old ApoE^{-/-} mice were exposed to low to moderate doses of γ ionizing radiation at low and high dose rates (1,4 mGy.h⁻¹ and 50 mGy.h⁻¹). They were sacrificed at day 10 post-irradiation, flow cytometry and qPCR were performed on indicated organs.



Online Figure 2: Gating strategy to identify circulating monocytes and splenic T cell subsets. Gating was first performed on forward versus side scatter (FSC vs SSC), cell debris and doublets were removed. **A:** Among monocytic CD11B+Gr1- cells, Ly6C High and Low subsets were detected. **B:** Among CD4+CD8- T cell lymphocytes, Regulatory T-cells (T-Regs), identified as CD25+FcγR3+ cells were detected. Among CD25-FcγR3- T cells, CD69+ pro-inflammatory T-cells were detected.

Bibliography

Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elaine, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, et F. Geissmann. 2007. « Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior ». *Science* 317 (5838): 666-70. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>.

Azizova, T. V., C. R. Muirhead, M. B. Druzhinina, E. S. Grigoryeva, E. V. Vlasenko, M. V. Sumina, J. A. O'Hagan, W. Zhang, R. G. E. Haylock, et N. Hunter. 2010. « Cardiovascular Diseases in the Cohort of Workers First Employed at Mayak PA in 1948–1958 ». *Radiation Research* 174 (2): 155-68. <https://doi.org/10.1667/RR1789.1>.

Baselet, Bjorn, Charlotte Rombouts, Abderrafi Mohammed Benotmane, Sarah Baatout, et An Aerts. 2016. « Cardiovascular Diseases Related to Ionizing Radiation: The Risk of Low-Dose Exposure (Review) ». *International Journal of Molecular Medicine* 38 (6): 1623-41. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2777>.

Bashar, Khalid, Donagh Healy, Mary Clarke-Moloney, Paul Burke, Eamon Kavanagh, et Stewart-Redmond Walsh. 2014. « Effects of Neck Radiation Therapy on Extra-Cranial Carotid Arteries Atherosclerosis Disease Prevalence: Systematic Review and a Meta-Analysis ». *PloS One* 9 (10): e110389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110389>.

Boivin, Jean-François, George B. Hutchison, Jay H. Lubin, et Peter Mauch. 1992. « Coronary artery disease mortality in patients treated for Hodgkin's disease ». *Cancer* 69: 1241-47.

Brunet, Alexandre, Manon LeBel, Benoit Egarnes, Carine Paquet-Bouchard, Anne-Julie Lessard, Jacques P. Brown, et Jean Gosselin. 2016. « NR4A1-Dependent Ly6Clow Monocytes Contribute to Reducing Joint Inflammation in Arthritic Mice through Treg Cells ». *European Journal of Immunology* 46 (12): 2789-2800. <https://doi.org/10.1002/eji.201646406>.

Ebrahimian, T. G., L. Beugnies, J. Surette, N. Priest, Y. Gueguen, C. Gloaguen, M. Benderitter, J. R. Jourdain, et K. Tack. 2017. « Chronic Exposure to External Low-Dose Gamma Radiation Induces an Increase in Anti-inflammatory and Anti-oxidative Parameters Resulting in Atherosclerotic Plaque Size Reduction in ApoE^{-/-}Mice ». *Radiation research* 189 (2): 187-96.

El-Saghire, Houssein, Arlette Michaux, Hubert Thierens, et Sarah Baatout. 2013. « Low Doses of Ionizing Radiation Induce Immune-Stimulatory Responses in Isolated Human Primary Monocytes ». *International Journal of Molecular Medicine* 32 (6): 1407-14. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1514>.

Freigang, Stefan, Franziska Ampenberger, Adrienne Weiss, Thirumala-Devi Kanneganti, Yoichiro Iwakura, Martin Hersberger, et Manfred Kopf. 2013. « Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling elicits inflammasome-independent IL-1 α and sterile vascular inflammation in atherosclerosis ». *Nature immunology* 14 (10): 1045–1053.

Frischholz, Birgit, Roland Wunderlich, Paul-Friedrich Rühle, Christine Schorn, Franz Rödel, Ludwig Keilholz, Rainer Fietkau, Udo S. Gaipl, et Benjamin Frey. 2013. « Reduced Secretion of the Inflammatory Cytokine IL-1 β by Stimulated Peritoneal Macrophages of Radiosensitive Balb/c Mice after Exposure to 0.5 or 0.7Gy of Ionizing Radiation ». *Autoimmunity* 46 (5): 323-28. <https://doi.org/10.3109/08916934.2012.747522>.

Fuster, Valentin, Pedro R Moreno, Zahi A Fayad, Roberto Corti, et Juan J Badimon. 2005. « Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts ». *Journal of the American College of Cardiology* 46 (6): 937–954.

Hildebrandt, Guido. 2010. « Non-Cancer Diseases and Non-Targeted Effects ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, NOTE: Towards a New Paradigm for Evaluating the Effects of Exposure to Ionizing Radiation*, 687 (1): 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.01.007>.

Hoving, Saske, Sylvia Heeneman, Marion J. J. Gijbels, Johannes A. M. te Poele, Nicola S. Russell, Mat J. A. P. Daemen, et Fiona A. Stewart. 2008. « 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* 71 (3): 848-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.02.031>.

Ishii, K, Kiyonori Yamaoka, Y Hosoi, T Ono, et K Sakamoto. 1995. « Enhanced mitogen-induced proliferation of rat splenocytes by low-dose whole-body X-irradiation. » *Physiological chemistry and physics and medical NMR* 27 (1): 17–23.

Joven, Jorge, Anna Rull, Natàlia Ferré, Joan Carles Escolà-Gil, Judit Marsillach, Blai Coll, Carlos Alonso-Villaverde, Gerard Aragones, Joan Claria, et Jordi Camps. 2007. « The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain ». *Atherosclerosis* 195 (2): e85–e92.

Kachikwu, Evelyn L., Keisuke S. Iwamoto, Yu-Pei Liao, John J. DeMarco, Nzhde Agazaryan, James S. Economou, William H. McBride, et Dörthe Schae. 2011. « Radiation Enhances Regulatory T Cell Representation ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 81 (4): 1128-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.09.034>.

Kamari, Yehuda, Aviv Shaish, Shay Shemesh, Einav Vax, Itamar Grosskopf, Shahar Dotan, Malka White, et al. 2011. « Reduced atherosclerosis and inflammatory cytokines in apolipoprotein-E-deficient mice lacking bone marrow-derived interleukin-1 α ». *Biochemical and biophysical research communications* 405 (2): 197–203.

Kirii, Hirokazu, Tamikazu Niwa, Yasuhiro Yamada, Hisayasu Wada, Kuniaki Saito, Yoichiro Iwakura, Masahide Asano, Hisataka Moriwaki, et Mitsuru Seishima. 2003. « Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23 (4): 656–660.

Klingenberg, Roland, Norbert Gerdes, Robert M. Badeau, Anton Gisterå, Daniela Strodthoff, Daniel F. J. Ketelhuth, Anna M. Lundberg, et al. 2013. « Depletion of FOXP3+ Regulatory T Cells Promotes Hypercholesterolemia and Atherosclerosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (3): 1323-34. <https://doi.org/10.1172/JCI63891>.

Le Gallic, Clélia, Yohann Phalente, Line Manens, Isabelle Dublineau, Marc Benderitter, Yann Gueguen, Stephanie Lehoux, et Teni G. Ebrahimian. 2015. « Chronic Internal Exposure to Low Dose ¹³⁷Cs Induces

Positive Impact on the Stability of Atherosclerotic Plaques by Reducing Inflammation in ApoE^{-/-} Mice ». Édité par Esther Lutgens. PLOS ONE 10 (6): e0128539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128539>.

Ley, Klaus, Carlo Laudanna, Myron I Cybulsky, et Sussan Nourshargh. 2007. « Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated ». *Nature Reviews Immunology* 7 (9): 678–689.

Liu, Rongjun, Shudao Xiong, Lei Zhang, et Yiwei Chu. 2010. « Enhancement of antitumor immunity by low-dose total body irradiation associated with selectively decreasing the proportion and number of T regulatory cells ». *Cellular & molecular immunology* 7 (2): 157–162.

Liu, SZ, ZB Han, et WH Liu. 1994. « Changes in lymphocyte reactivity to modulatory factors following low dose ionizing radiation. » *Biomedical and environmental sciences: BES* 7 (2): 130–135.

Liu, SZ, YC Zhang, Y Zhao, et others. 1994. « Signal transduction in lymphocytes after low dose radiation. » *Chinese medical journal* 107 (6): 431–436.

Lutgens, Esther, et Mat JAP Daemen. 2001. Transforming growth factor- β : a local or systemic mediator of plaque stability? *Am Heart Assoc.*

Mancuso, Mariateresa, Emanuela Pasquali, Ignacia Braga-Tanaka, Satoshi Tanaka, Alessandro Pannicelli, Paola Giardullo, Simonetta Pazzaglia, Soile Tapio, Michael J Atkinson, et Anna Saran. 2015. « Acceleration of Atherogenesis in ApoE^{-/-} Mice Exposed to Acute or Low-Dose-Rate Ionizing Radiation ». *Oncotarget* 6 (31). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5075>.

Mancuso, Mariateresa, Emanuela Pasquali, Ignacia Braga-Tanaka III, Satoshi Tanaka, Alessandro Pannicelli, Paola Giardullo, Simonetta Pazzaglia, Soile Tapio, Michael J. Atkinson, et Anna Saran. 2015. « Acceleration of atherogenesis in ApoE^{-/-} mice exposed to acute or low-dose-rate ionizing radiation ». *Oncotarget* 6 (31): 31263.

McGale, Paul, Sarah C. Darby, Per Hall, Jan Adolfsson, Nils-Olof Bengtsson, Anna M. Bennet, Tommy Fornander, Bruna Gigante, Maj-Britt Jensen, et Richard Peto. 2011. « Incidence of heart disease in 35,000 women treated with radiotherapy for breast cancer in Denmark and Sweden ». *Radiotherapy and Oncology* 100: 167-75.

Mitchel, R. E. J., M. Hasu, M. Bugden, H. Wyatt, M. P. Little, A. Gola, G. Hildebrandt, N. D. Priest, et S. C. Whitman. 2011a. « Low-dose radiation exposure and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice ». *Radiation research* 175 (5): 665-76.

—. 2011b. « Low-Dose Radiation Exposure and Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice ». *Radiation Research* 175 (5): 665-76. <https://doi.org/10.1667/RR2176.1>.

Mothersill, Carmel, et C. B. Seymour. 2006. « Radiation-Induced Bystander Effects and the DNA Paradigm: An "out of Field" Perspective ». *Mutation Research* 597 (1-2): 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.10.011>.

Moulton, Karen S, Khashayar Vakili, David Zurakowski, Mohsin Soliman, Catherine Butterfield, Erik Sylvén, Kin-Ming Lo, Stephen Gillies, Kashi Javaherian, et Judah Folkman. 2003. « Inhibition of plaque

neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (8): 4736–4741.

Mulrooney, Daniel A., Gregory T. Armstrong, Sujuan Huang, Kirsten K. Ness, Matthew J. Ehrhardt, Vijaya M. Joshi, Juan Carlos Plana, Elsayed Z. Soliman, Daniel M. Green, et Deokumar Srivastava. 2016. « Cardiac outcomes in adult survivors of Childhood cancer exposed to cardiotoxic therapy: a cross-sectional study ». *Annals of internal medicine* 164: 93-101.

Nageh, Maged F, Eric T Sandberg, Keith R Marotti, Alice H Lin, Earline P Melchior, Daniel C Bullard, et Arthur L Beaudet. 1997. « Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17 (8): 1517–1520.

Nakatsukasa, Hiroko, Mitsutoshi Tsukimoto, Akihiro Tokunaga, et Shuji Kojima. 2010. « Repeated gamma irradiation attenuates collagen-induced arthritis via up-regulation of regulatory T cells but not by damaging lymphocytes directly ». *Radiation research* 174 (3): 313-24.

Newby, Andrew C. 2005. « Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture ». *Physiological reviews* 85 (1): 1–31.

Pandey, Ruchi, Bhavani S Shankar, Deepak Sharma, et Krishna B Sainis. 2005. « Low dose radiation induced immunomodulation: effect on macrophages and CD8+ T cells ». *International journal of radiation biology* 81 (11): 801–812.

Rahman, Mohammed Shamim, et Kevin Woollard. 2017. « Atherosclerosis ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1003: 121-44. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_7.

Robertson, Anna-Karin L., Mats Rudling, Xinghua Zhou, Leonid Gorelik, Richard A. Flavell, et Göran K. Hansson. 2003. « Disruption of TGF- β Signaling in T Cells Accelerates Atherosclerosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 112 (9): 1342-50. <https://doi.org/10.1172/JCI18607>.

Rodel, F., B. Frey, U. Gaipl, L. Keilholz, C. Fournier, K. Manda, H. Schöllnberger, G. Hildebrandt, et C. Rodel. 2012. « Modulation of Inflammatory Immune Reactions by Low-Dose Ionizing Radiation: Molecular Mechanisms and Clinical Application ». *Current Medicinal Chemistry* 19 (12): 1741-50. <https://doi.org/10.2174/092986712800099866>.

Roedel, F., N. Kley, H. U. Beuscher, G. Hildebrandt, L. Keilholz, P. Kern, R. Voll, M. Herrmann, et R. Sauer. 2002. « Anti-Inflammatory Effect of Low-Dose X-Irradiation and the Involvement of a TGF-Beta1-Induced down-Regulation of Leukocyte/Endothelial Cell Adhesion ». *International Journal of Radiation Biology* 78 (8): 711-19. <https://doi.org/10.1080/09553000210137671>.

Schöllnberger, Helmut, Markus Eidemüller, Harry M. Cullings, Cristoforo Simonetto, Frauke Neff, et Jan Christian Kaiser. 2018. « Dose-Responses for Mortality from Cerebrovascular and Heart Diseases in Atomic Bomb Survivors: 1950–2003 ». *Radiation and Environmental Biophysics* 57 (1): 17-29. <https://doi.org/10.1007/s00411-017-0722-5>.

Schröder, Sabine, Dajana Juerß, Stephan Kriesen, Katrin Manda, et Guido Hildebrandt. 2019. « Immunomodulatory properties of low-dose ionizing radiation on human endothelial cells ». *International journal of radiation biology* 95 (1): 23–32.

Seegenschmiedt, Michael Heinrich, Hans-Bruno Makoski, Klaus-Rüdiger Trott, et Luther W. Brady, éd. 2008. *Radiotherapy for Non-Malignant Disorders. Medical Radiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-68943-0>.

Sharma, Shilpa, Neha Singla, Vijayta Dani Chadha, et DK Dhawan. 2019. « A concept of radiation hormesis: stimulation of antioxidant machinery in rats by low dose ionizing radiation. » *Hellenic journal of nuclear medicine* 22 (1): 43–48.

Shimizu, Yukiko, Kazunori Kodama, Nobuo Nishi, Fumiyoshi Kasagi, Akihiko Suyama, Midori Soda, Eric J. Grant, Hiromi Sugiyama, Ritsu Sakata, et Hiroko Moriwaki. 2010. « Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003 ». *Bmj* 340: b5349.

Shin, Suk Chul, Kyung-Mi Lee, Yu Mi Kang, Kwanghee Kim, Cha Soon Kim, Kwang Hee Yang, Young-Woo Jin, Chong Soon Kim, et Hee Sun Kim. 2010. « Alteration of cytokine profiles in mice exposed to chronic low-dose ionizing radiation ». *Biochemical and biophysical research communications* 397 (4): 644–649.

Song, Kyung-Hee, Mi-Hyoung Kim, Seong-Mook Kang, Seung-Youn Jung, Jiyeon Ahn, Hee-Jong Woo, Seon Young Nam, Sang-Gu Hwang, Sang-Young Ryu, et Jie-Young Song. 2015. « Analysis of immune cell populations and cytokine profiles in murine splenocytes exposed to whole-body low-dose irradiation ». *International journal of radiation biology* 91 (10): 795–803.

Swirski, Filip K, Peter Libby, Elena Aikawa, Pilar Alcaide, F William Luscinskas, Ralph Weissleder, Mikael J Pittet, et others. 2007. « Ly-6C hi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata ». *The Journal of clinical investigation* 117 (1): 195–205.

Tabas, Ira, et Andrew H. Lichtman. 2017. « Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis ». *Immunity* 47 (4): 621-34. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.008>.

Tacke, Frank, David Alvarez, Theodore J Kaplan, Claudia Jakubzick, Rainer Spanbroek, Jaime Llodra, Alexandre Garin, et al. 2007. « Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques ». *The Journal of clinical investigation* 117 (1): 185–194.

Teresa Pinto, Ana, Marta Laranjeiro Pinto, Ana Patrícia Cardoso, Cátia Monteiro, Marta Teixeira Pinto, André Filipe Maia, Patrícia Castro, et al. 2016. « Ionizing Radiation Modulates Human Macrophages towards a Pro-Inflammatory Phenotype Preserving Their pro-Invasive and pro-Angiogenic Capacities ». *Scientific Reports* 6 (janvier): 18765. <https://doi.org/10.1038/srep18765>.

Ting, Harold J, James P Stice, Ulrich Y Schaff, David Y Hui, John C Rutledge, Anne A Knowlton, Anthony G Passerini, et Scott I Simon. 2007. « Triglyceride-rich lipoproteins prime aortic endothelium for an enhanced inflammatory response to tumor necrosis factor- α ». *Circulation research* 100 (3): 381–390.

Tsukimoto, Mitsutoshi, Takujiro Homma, Yasuko Mutou, et Shuji Kojima. 2009. « 0.5 Gy Gamma Radiation Suppresses Production of TNF-Alpha through up-Regulation of MKP-1 in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells ». *Radiation Research* 171 (2): 219-24. <https://doi.org/10.1667/RR1351.1>.

Virmani, Renu, Frank D Kolodgie, Allen P Burke, Alope V Finn, Herman K Gold, Thomas N Tulenko, Steven P Wrenn, et Jagat Narula. 2005. « Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25 (10): 2054–2061.

Wang, Baofeng, Baohua Li, Zhijun Dai, Song Ren, Minghua Bai, Zhongwei Wang, Zongfang Li, et al. 2014. « Low-dose splenic radiation inhibits liver tumor development of rats through functional changes in CD4+ CD25+ Treg cells ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 55: 98–108.

Williams, Jacqueline, Yuhchyan Chen, Philip Rubin, Jacob Finkelstein, et Paul Okunieff. 2003. « The Biological Basis of a Comprehensive Grading System for the Adverse Effects of Cancer Treatment ». *Seminars in Radiation Oncology* 13 (3): 182-88. [https://doi.org/10.1016/S1053-4296\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S1053-4296(03)00045-6).

Woollard, Kevin J., et Frederic Geissmann. 2010. « Monocytes in Atherosclerosis: Subsets and Functions ». *Nature Reviews Cardiology* 7 (2): 77-86. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.228>.

Zhou, X., A. Nicoletti, R. Elhage, et G. K. Hansson. 2000. « Transfer of CD4(+) T Cells Aggravates Atherosclerosis in Immunodeficient Apolipoprotein E Knockout Mice ». *Circulation* 102 (24): 2919-22. <https://doi.org/10.1161/01.cir.102.24.2919>.

II. Résultats (2)

Etude des effets des faibles doses de rayonnements ionisants γ sur le modèle murin ApoE^(-/-) prédisposé à l'athérosclérose dans la polarisation des macrophages à court terme après irradiation et études des conséquences phénotypiques et immunitaires sur la plaque d'athérosclérose à long terme

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence les effets engendrés par une exposition à une gamme de doses faibles à modérées de rayonnements ionisants, d'abord à court délai post irradiation dans l'étude de la polarisation des macrophages, puis à long terme pour l'étude des conséquences phénotypiques et immunitaires dans la plaque d'athérosclérose.

Des souris ApoE^(-/-) ont été exposées à des doses faibles et modérées de rayonnements ionisants γ à débit de dose élevé. Nous avons constaté une augmentation significative, dose dépendante, de l'expression géniques des marqueurs anti-inflammatoires Chil-3 et Retn1a parmi les macrophages de type M0 et M2 après 24 heures d'exposition et aucun effet sur les macrophages M1. Ces effets ont été associés à une augmentation dose-dépendante de l'IL-10 et à une réduction des sécrétions d'IL-1 dans les macrophages de type M0 et M2 et à une augmentation de l'IL-6 dans les macrophages M1. Les proportions de monocytes pro-inflammatoires Ly6C^{High} circulants ont été diminuées à 24 heures et les proportions de monocytes anti-inflammatoires Ly6C^{Low} ont été considérablement augmentées dans la rate 100 jours après l'irradiation.

L'exposition à long terme à n'a pas été affecté, à l'ensemble des doses, la taille de la plaque d'athérome et le contenu en collagène déterminé respectivement par la coloration rouge Oil red O et picosirius. Cependant, une réduction significative de la teneur en macrophages de 85% a été observée à 1Gy.

L'ensemble de ces résultats montre que les doses faibles à modérées de rayonnements ionisants renforcent les fonctions anti-inflammatoires des macrophages M2 lors d'une exposition à court terme, associées à une réduction des macrophages intra-plaque exprimant CD68 lors d'une exposition à long terme chez les souris ApoE^(-/-). Ces résultats indiquent un effet athéroprotecteur de doses faibles à modérées de rayonnements ionisants dans un modèle de souris prédisposées à l'athérosclérose par la régulation des macrophages.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article en cours de finalisation.

Low to moderate dose ^{137}Cs (γ) radiation enhances M2 type macrophages function at short term associated with reduced plaque inflammation at long term exposure in ApoE^(-/-) mice.

¹N. Rey, ²T. Ebrahimian, ¹C. Gloaguen, ¹D. Kereselidze, ¹C. Brizais, ¹F. Bachelot, ¹G. Riazi, ¹V. Monceau
¹Demarquay, ¹I. Garali Zineddine, ¹D. Klovov, ³K. Balabanian, ²S. Lehoux, ¹T.G. Ebrahimian.

1. Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, laboratoire de radiotoxicologie et de radiobiologie expérimentale, 92260, Fontenay-aux Roses-France.

2. McGill University, Division of Experimental Medicine, Montreal, Canada.

3. Institut de Recherche Saint-Louis, Inserm U1160, 75010 Paris.

Corresponding Author

Dr. Teni Ebrahimian

Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, laboratoire de radiotoxicologie et de radiobiologie expérimentale

31 Avenue de la division Leclerc

92262, Fontenay-aux Roses, France

Phone : +33(1)58357007

E-mail : teni.ebrahimian@irsn.fr

Abstract

Effects of low doses of ionizing radiation on atherosclerosis are still a source of many uncertainties, and in particular whether these effects generate anti or pro-inflammatory responses. Furthermore, the delay of occurrence of such effects upon irradiation are unknown. Atheroprone ApoE^(-/-) mice were exposed to single doses of 0, 0.05, 0.5 and 1 Gy of ¹³⁷Cs (γ) at 10.35 mGy.min⁻¹ dose rate. Short term (24 hours) effects on bone marrow-derived macrophage polarization and long term (100 days) consequences on atherosclerotic plaques were investigated. We found a significant dose-dependent increase of gene expression of Chil-3 and Retnla anti-inflammatory markers in M0 and M2 type macrophages upon 24 hours exposure and no effects on M1 types. These effects were associated with a dose-dependent increase of IL-10 and a reduction of IL-1 secretions in M0 and M2 and an increase of IL-6 in M1 type macrophages. Circulating pro-inflammatory Ly6C^{High} monocytes were reduced at 24 hours and anti-inflammatory Ly6C^{Low} monocytes were notably increased in the spleen 100 days upon irradiation.

Long term exposures to any doses did not affect atherosclerotic plaque size and collagen contents determined by Oil red O and picosirius red staining respectively. However, a significant reduction of macrophage content by 85% was observed at 1Gy only.

Taking together these findings show that low to moderate doses of ionizing radiation enhance anti-inflammatory functions of M2 macrophages at short term exposure associated with a reduction of plaque CD68-expressing macrophages at long term exposure in ApoE^(-/-) mice. These results indicate an atheroprotective effect of low to moderate doses of ionizing radiation in an atheroprone mouse model through regulation of macrophages.

Introduction

Exposure to low dose of γ radiation concerns thousands of people and in particular people living in areas close to Chernobyl or Fukushima power plant. Elucidating the impact of low to moderate dose ionizing radiation (LMDIR) on atherosclerosis is still an ongoing process. It is well reported that cardiovascular diseases are aggravated with exposure to ionizing radiation (Mulrooney et al. 2016; Hoving et al. 2008; Shimizu et al. 2010; McGale et al. 2011; Bashar et al. 2014; Boivin et al. 1992). However, extrapolation through linear no threshold model does not seem to be reliable with low dose exposure and cardiovascular disease (Vaiserman et al. 2018) and statistical limits prevent the risk-assessment under 0.5 Gy (Baselet et al. 2016). Dose of exposure is determinant in predicting outcome of effects. Recent studies have shown that effects caused by high doses are different from those caused by low doses. Indeed, Mitchel et al. (Mitchel et al. 2011) showed that effects of low doses were nonlinear in ApoE^(-/-) model and were atheroprotective. In contrast, Mancuso et al (Mancuso et al. 2015) showed a decrease in plaque density with chronic as opposed to acute exposure leading to detrimental effects on the cardiovascular system. Le Gallic et al (Le Gallic et al. 2015a) demonstrated that exposure to chronic LMDIR enhances plaque stability of ApoE^(-/-) mice. These results confirm the modulatory effects of LMDIR in pre-existing inflammatory conditions (Franz Rödel et al. 2009; F Rödel et al. 2004; Lödermann et al. 2012; Hildebrandt et al. 2003; Dörthe Schaeue et al. 2005; D. Schaeue, Marples, et Trott 2002; Franz Rödel et al. 2004). One of the questions that has not yet been addressed, is long term effects of LMDIR on atherosclerosis. These studies reported that exposure to high doses ionizing radiation had late effects on human body (Kamiya et al. 2015) however, the possible long-term effects of LMDIR are still unclear.

In the context of atherosclerosis long term effects of LMDIR, in term of lesions size, stability and composition are unknown. A clinical study demonstrated that repeated LMDIR for a final dose of 3 Gy could have beneficial long-term effects on painful skeletal disorder (Juniku et al. 2019).

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of medium and large arteries that could lead to myocardial infarction or stroke (Gister\aa et Hansson 2017). Plaque development is driven by entry of oxidized low-density lipoprotein in the intima of arteries, triggering a pro-inflammatory reaction leading to transmigration of monocytes and their differentiation into macrophages that internalize ox-LDL through scavenger receptors expressed on the surface of the cells and become foam cells. Foam cells contribute to plaque fragility. On the other hand, enrichment of smooth muscle cells within the plaque increases the stability, mainly by their capacity to produce collagen.

Indeed, innate immune system is essential for the development and progression of atherosclerosis with main effectors being monocytes and macrophages (Gister\aa et Hansson 2017). Two subsets of circulating monocytes are identified in mice, The pro-inflammatory Ly6C^{High} and patrolling Ly6C^{Low} (Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Yona et al. 2013; Geissmann, Jung, et Littman 2003; Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Ly6C^{High} subpopulation (Tacke et al. 2007; Swirski et al. 2007), expresses high levels of chemokine receptors CC-chemokine receptor 2 (ccr2) (Geissmann, Jung, et Littman 2003) and could originate from the bone marrow and the spleen and give rise to M1 type pro-atherogenic macrophages (Robbins et al. 2012). They produce pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-18, IL-12, INF- γ or IL-1. Ly6C^{Low} subpopulation is involved in wound repair and tissue remodeling (Auffray et al. 2007). They preferentially express cx3c-chemokine receptor 1 (cx3cr1) (Geissmann, Jung, et Littman 2003), and give rise to M2 type athero protective macrophages (Auffray et al. 2007; Brunet et al. 2016). They produce anti-inflammatory cytokines such as TGF- β or IL-10 (Sica et Mantovani 2012; Martinez et Gordon 2014; Murray et al. 2014a).

T cells are also an important cell population within the atherosclerotic plaque (Song et al. 2001), contributing to plaque development. There are also different T cell subtypes with pro- or anti-inflammatory properties (Tabas et Lichtman 2017).

The aim of this study is to investigate short term effects of low to moderate doses of irradiation on macrophage properties and function, in terms of polarization, gene expression and cytokine production. As well as presence of potential long-term consequences on atherosclerotic plaque phenotype.

Materials and methods

Animals

14, 15 and 16 weeks old ApoE^(-/-) mice were purchased from and were maintained in our animal facility. Experiments were evaluated and approved by an internal evaluation of an animal ethical committee. 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 (Joven et al. 2007). Animals were maintained in a specific-pathogen-free environment and monitored daily.

Irradiation

Mice were exposed to low to moderate doses of ionizing radiation comprised of 0.05, 0.5 and 1 Gy of external γ rays from ¹³⁷Cs with a single dose rate (10.35 mGy.min⁻¹). Mice were sacrificed 24h, and 100 days (long term) post irradiation. Short term studies were used for primary culture cells and analysis of macrophage polarization. Long term studies were put in place in order to study long term phenotypical impact of ionizing radiation in the atherosclerotic plaque.

Isolation of bone-marrow-derived macrophages

For cell isolation, femurs were isolated and placed in sterile petri dish containing sterile medium (RPMI 1640+ 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin/penicillin) culture. Bone marrow was then extracted from femur through flushing with 25-G needle cells are then filtered with a 70 μ m filter and centrifuge 10 min 500g at room temperature. Cells were counted and dispatched into 6-well cell culture plate at a concentration of 1.10⁶ cells.ml⁻¹ and then incubated at 37°C in 5% CO₂/95% air for 1 hour prior medium change with RPMI 1640/10%/1%P/S with 50 ng.ml⁻¹ of Macrophage-Colony-Stimulating factor (M-CSF) (Preprotech ref #315-02). Cells were maintained in culture for 5 days, with change of medium every 48 hours to remove non-adherent cells. On the fifth day, cells were polarized with IL-4 (10 ng.ml⁻¹) (Preprotech ref #214-14) for M2 polarization and with INF γ (50ng.ml⁻¹) (Preprotech ref #315-05) for M1 polarization for a duration of 24 hours.

Coloration

Mice sacrificed 100 days post irradiation had hearts and aortas frozen in OCT. Cry sections of 7 μ m thickness were cut throughout the aortic sinus at several key points of the aortas for histological and immunohistochemical analysis. Images were acquired using Leica DM4000B or with Zeiss, Axio Scan Z1. Mean Lesions and atherosclerotic area were calculated using Histolab software. Quantification of the positive stain area of plaque components was calculated as a proportion of total lesion area.

Collagen and lipid staining

Five to ten sections per animal were stained with Oil Red O (Sigma-Aldrich) in order to evaluate lipid content in plaque, and 5-10 sections per animal were stained with picro-sirius red (Sigma Aldrich) to evaluate collagen content.

Smooth muscle alpha-actin and macrophage immunostaining.

Macrophage plaque content and Vascular smooth muscle cell were determined by immunofluorescence with PE anti-mouse CD68 (diluted 1.100) (Biolegend clone FA-11) and with mouse monoclonal anti- α -smooth muscle combined with FITC (diluted 1.250) (Sigma-Aldrich F3777). Lymphocytes content was assessed with rabbit anti-human CD3 (diluted 1.100) (DAKO, #A0452) and with secondary antibody goat-anti rabbit AF488 (diluted 1.400). Five to Seven sections were stained per animal. Nuclei was stained with DAPI.

Cytokine Secretion Assay.

Cell culture supernatants of polarized macrophages were harvested and stored at -80°C . IL-10 (M1000B), TGF- β (MB100B), TNF- α (MTA00B), IL-6 (M6000B), and IL-1 β /IL-1F2 (MLB00C) levels were determined with ELISA kits (R&D Systems). ELISA's were performed according to manufacturer's instructions. Briefly, 50 μl of undiluted supernatant were incubated in flat transparent 96 well plate pre-coated with primary antibody for 2 hours and washed 4 or 5 times with a wash buffer solution containing distilled water and purchased wash buffer concentrate. After incubation, secondary antibody is added and incubated for another 2 hours and washed. Samples are then revealed after a 30-minute incubation by adding 100 μl of tetramethylbenzidine per well and reaction is stopped with 100 μl solution of diluted hydrochloric acid. Absorbance was measured in a microplate reader at 450 nm and weightlent correction was applied at 540 nm.

Flow cytometry

All organs (spleen, blood) were labeled with a mix of 6 antibodies CD115 (PE/Cy7 anti-mouse clone AF598 Biolegend #135524), CD11b (Efluor450 Clone M1/70 # 48-9668-80, Invitrogen), Ly6C (APC, clone RB6-8C5, # 17-5931-82), Ly6Gr1 (FITC, clone 1A8-Ly6g #11-0112), Cx3CR1 (Percp/Cy5.5 anti-mouse clone 5A011F11 #149010 Biolegend), CCR2 (PE #150610, clone 5A203G11 Biolegend).

Briefly, blood Cells (1.10^6 blood cells) were treated with ACK lysis buffer in order to deplete erythrocytes. Then samples were labeled for 15 minutes with FcR blocking reagent (# 130-059-901- Mylteni) to prevent non-specific labeling. Cells were then washed with PBS after centrifugation (500 g).

Bone marrow Cells were collected by flushing of bone marrow cells of mice femur. (1.10^6 cells). Cells were then labeled with FcR blocking reagent and then with antibody mix. For Spleen cells, spleen was mashed and then filtered with a 70 μm filter. Cells were then collected, labeled with with FcR blocking reagent to prevent non-specific labeling, and then labeled with the antibody mix. Cells were then washed with PBS after centrifugation (500 g). Cells were washed twice with PBS containing 2% of FBS. Samples of labeled cells were then kept in cold ice in the dark until their passage in the cytometer. For BMDM cell culture, cells were removed from the 6 well plates and placed in PBS at 4°C at 1.10^{-6} cells per tube and stained with FcR blocking reagent (# 130-059-901- Mylteni) for 15 minutes and labeled with a mix of CD11b (PeCy7 clone M1/70 #11-0112-82 Invitrogen), F4-80 (PE clone 30 F11 #12-4801-82 Invitrogen) CD 206 (APC #46879 Invitrogen).

Fluorescence was measured by cytometry using FACSCanto II (BD Biosciences) and analyzed with Flowjo Software. Compensation beads were used for color compensation, and FMO samples were used as negative control.

PCR

Total RNA was extracted from bone-Marrow-Derived Macrophages using Tri-Reagent Solution (Life technologies-T9424). RNA concentration was determined using Nanodrop ND1000 spectrophotometer and RNA purity was assessed using Agilent 2100 Bioanalyzer. One microgram of total RNA was synthesized to 20 μ l for complementary DNA (cDNA), using the high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit from Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific Baltics UAB) according to manufacturer's protocol and performed with SYBR Mastercycler gradient (#5331). Quantitative chain polymerase reaction analysis was performed with a QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Life technologies) using a standard cycler protocol (50°C for 2 minutes followed by 10 minutes at 95°C, then starting with the first cycle, 95°C for 15 seconds, and 60 °C for 1 minute followed by a melting curve, 95°C for 15 seconds, 60°C for 1 minute, and 95°C for 15 seconds repeated 40 times). All samples were normalized to Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), Hprt (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) and β actin by geometric mean. The control sample serves as a reference value of 1. All samples were run in duplicate and quantification was performed using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The following primer set were used: Hprt (Forward: TCAGTCAACGGGGACATAAA, Reverse: GGGGCTGACTGCTTAACCAG). Gapdh (Forward : AGGTCGGTGTGAACGGATTTG, Reverse : TG TAGACCATGTAGTTGAGGTCA) β -actin (Forward : AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG, Reverse : TCCCTGGAGAAGAGCTACGA) Interleukin 6 (Forward : CCTTCTGGGACTGATGCTGGTG, Reverse : AGGTCTGTTGGGAGTGGTATCCTC) Arginase 1 (Forward : CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG, Forward : CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG) Retn1a (Forward : GGAGCTGTCATTAGGGACATCA, Reverse : TCCCAAGATCCACAGGCAAA) Chil-3 (Forward : TCTGGGTACAAGATCCCTGAA, Reverse : TTTCTCCAGTGTAGCCATCCTT) TNF- α (Forward : AGCCGATGGGTTGTACCTTG Reverse : GTGGGTGAGGAGCACGTAGTC) EGR2 (Forward : CCCTTGACCAGATGAACGGAG, Reverse : AAGCTACTCGGATACGGGAGATC).

Statistical Analysis

In our study, we present two approaches of statistical analysis. The first approach is for univariate analysis while the second one is to multivariate analysis. Univariate involves the analysis of a single variable and multivariate analysis examines all variables, which will give a better idea regarding the variances involved with the data. Results to univariate analysis are presented as means \pm SEM. Data were compared with two-way analysis of variance (ANOVA) or two-way ANOVA for repeated measures, with all ANOVA tests followed by a Student–Newman–Keuls posthoc test, or with an unpaired t-test, as appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant. In the case of multivariate analysis, we use multi-blocks analysis (Regularized Generalized Canonical Correlation Analysis, RGCCA) as described in Garali et al, (Garali et al. 2018). From a statistical data analysis point of view, RGCCA subsumes a remarkably large number of well-known methods. Briefly, for polarization experiment we combine data from flow cytometry, genic expression and ELISA assay in order to evaluate the impact of irradiation on multiple parameters (M-CSF, IL4, INF γ). We consider each type of data as a block (a modality). We then illustrate how relationships between the most relevant variables can be displayed and we interpret the results by visualizing the observations and variables in a common space. In the search of biomarkers associated with the irradiation dose rate we apply RGCCA to identify variables from the three blocks

(flow cytometry, genic expression and ELISA data). The between-block connection associated with this objective of analysis is presented in Figure 2 with an additional connection between the superblock and the irradiation dose. A superblock is defined as the concatenation of all the blocks and the corresponding global components can be derived. The space spanned by the global components is viewed as a compromise space that integrates all the modalities, which is called a common space. In order to ensure comparability between variables and blocks, the data have to be preprocessed. To make variables comparable, we standardize our data (zero mean and unit variance) and we opt for a strategy that divides each block by the square root of its number of variables (Westerhuis, Kourti, et MacGregor 1998).

Results

LMDIR enhances genic expression of anti-inflammatory Chil-3, Retnla, Arg-1 and EGR2 in M0 and M2 macrophages upon 24 hours irradiation.

Since Low dose of ionizing radiations regulates inflammation, and macrophages are one of the most important regulator in atherosclerosis; we investigated the effects of LMDIR on bone marrow-derived macrophages in ApoE^(-/-) mice in terms of phenotype and secretary function.

In M0 (no polarization), M1 (polarized with INF γ) or M2 (polarized with IL-4) types, pro- and anti-inflammatory gene expression was measured. In M0 we observed a significant increase of anti-inflammatory markers: Chil-34.5 times and Arg-1 ~3 times at 1 Gy exposure. In contrast, TNF- α expression was two times reduced at 0.5 Gy ($p=0.006$). (Fig.1A).

In M1 type, we did not observe significant changes at any dose of exposure. (Fig.1B).

In M2 type, a significant increase with indicated doses, of Chil-3 (3.1-fold at 0.05 Gy- 2.8-fold at 0.5 Gy, 2.15 fold at 1 Gy), Retnla (1.6 fold at 0.05 Gy, ~2 fold at 0.5 Gy and 1.7 fold at 1 Gy), Arg-1 and Egr-2 (1.67 and 1.43 fold respectively at 1Gy). No difference in pro-inflammatory markers, IL-6 and TNF- α were observed. (Fig. 1C).

Expression of these genes was equivalent between groups in the three type of macrophages upon 10 days of irradiation (data not shown).

Figure 1.

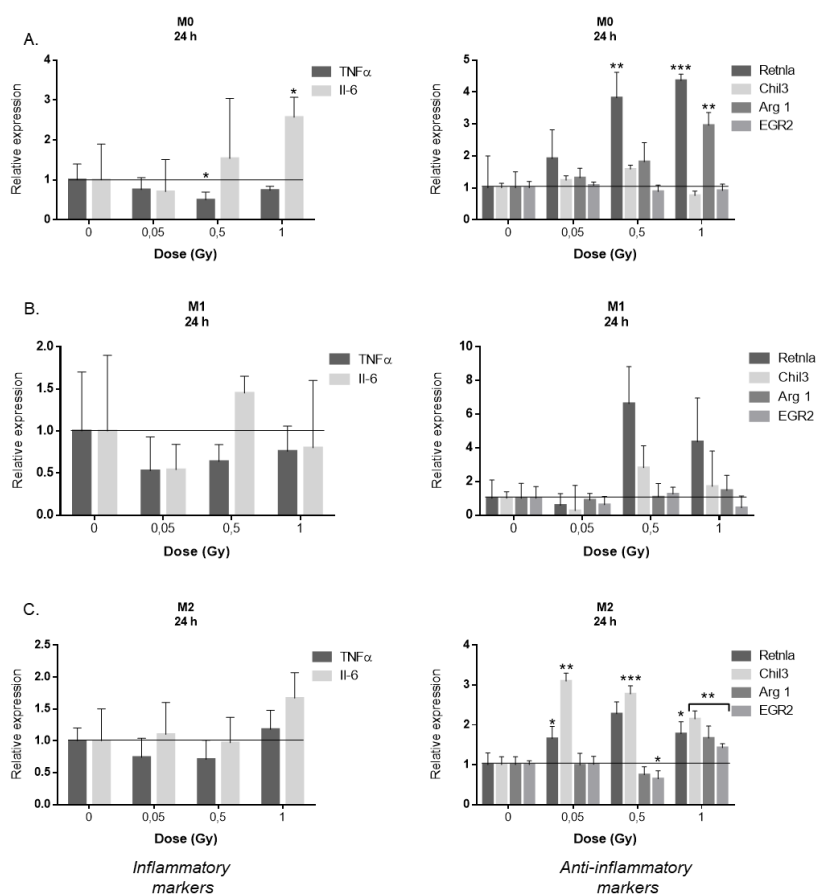


Fig 1. Exposure to low to moderate doses of irradiation enhances anti-inflammatory markers in M2 and M0 macrophages upon 24 hours. ApoE^{-/-} mice were exposed to 0, 0.05, 0.5 and 1 Gy of γ irradiation. Primary bone marrow-derived macrophages were extracted upon 24hours and polarized into M0 (Fig.1-A), M1 (Fig.1-B) or M2 (fig.1-C) macrophages. Genic expression of pro-inflammatory (IL-6, TNF α) and anti-inflammatory (EGR2, Arg-1, Chil3, Retnla) markers were determined by qPCR. Samples were run in duplicates and normalized with gapdh, hprt and β actin using geometric mean and using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Control samples serves as reference value of 1. Results are expressed as fold change vs non-irradiated control mice. Data are mean of fold change (\pm) SEM of n=3 to 4. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

LMDIR enhances IL-10 production by M0 and M2 and IL-6 production by M1 macrophages upon 24 hours irradiation.

To evaluate if upregulation of anti-inflammatory genes in M0 and M2 macrophages leads to an increase of cytokine production; we measured anti-inflammatory (IL-10 and TGF- β) and pro-inflammatory (IL-6, TNF- α and IL-1) cytokine secretion in the conditioned medium of M0, M1 and M2 macrophages upon 24hours of irradiation. In M0 type, IL-10 was enhanced by 1.7 and 1.5-fold at 0.5 Gy and 1Gy respectively ($p=0.029$). (Fig.2-A). Similarly, in M2 type a significant increase of IL-10 by 2-3 folds, at 0.05, 0.5 and 1Gy was observed as well. However, an unexpected increase of TNF- α by 8-fold was observed at 0.5Gy. (Fig.2-C). In contrast, in M1 type, only IL-6 was increased by 3-fold at 0.5Gy. (Fig.2-B).

Figure 2

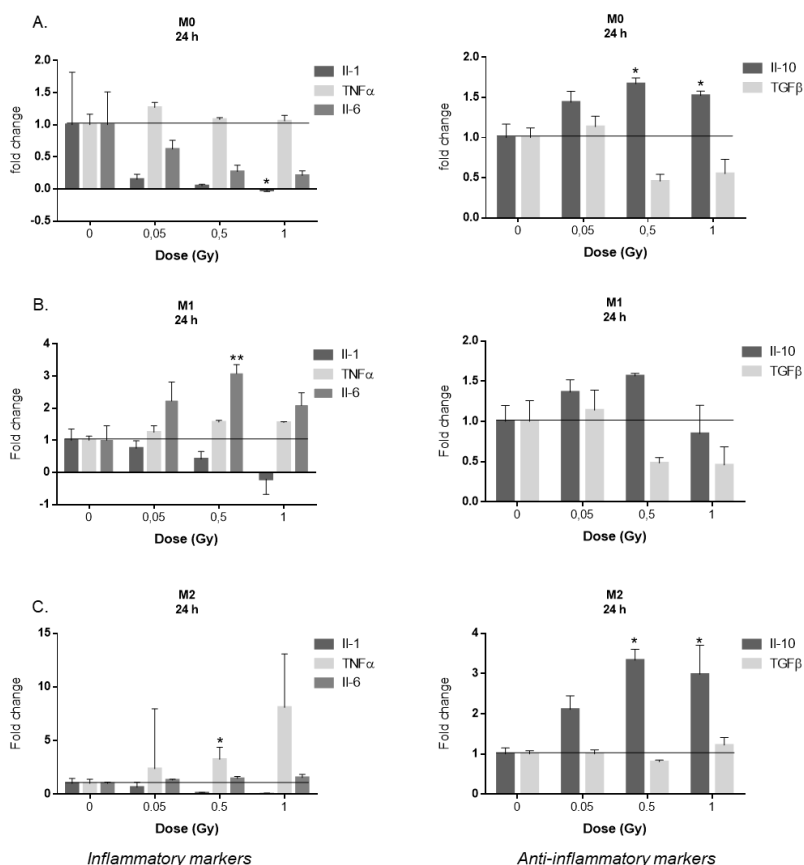


Fig 2. Exposure to low to moderate doses of irradiation enhances anti-inflammatory IL-10 secretion in M2 and M0 macrophages upon 24 hours. ApoE^{-/-} mice were exposed to 0, 0.05, 0.5 and 1 Gy of γ irradiation. Primary bone marrow-derived macrophages were extracted upon 24 hours and polarized into M0 (Fig.2-A), M1 (Fig.2-B) or M2 (Fig.2-C) macrophages. Secretion of pro-inflammatory (IL-6, TNF α , IL-1) and anti-inflammatory (TGF β , IL-10) cytokines were measured by Elisa in the conditioned medium of these cells. Control samples serves as reference value of 1. Results are expressed as fold change vs non-irradiated control mice. Data are mean of fold change (\pm) SEM of n=3 to 4. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Superblock analysis confirmed increased IL-10 production by M0 and M2 macrophages at 0.5 and 1 Gy.

No notable changes seem to be induced by irradiation when considering only phenotype parameters of macrophages (data not shown).

GCCA analysis combining rtPCR, ELISA and flow cytometry showed a clear separation according to component 1 group (Fig. 3-1). For M0 macrophages between lower doses, 0 and 0.05 Gy and higher doses, 0.5 and 1 Gy at 24 hours upon irradiation. Separation of lower doses was correlated with IL-1 secretion, whereas 0.5 and 1 Gy were associated with IL-10 secretion and F480-CD206+ M2 phenotype. For M1 macrophages, we observed a more pro inflammatory cytokine secretion such as IL-1 that was significantly associated with lower doses, and TNF- α correlated with 0.5 and 1 Gy (Fig. 3-2). M2 types had a similar response to M0 macrophages. 0 and 0.05 Gy showed an increase of IL-1 secretion, and IL-10 was significantly correlated with 0.5 and 1 Gy. (Fig 3-3).R

Figure 3

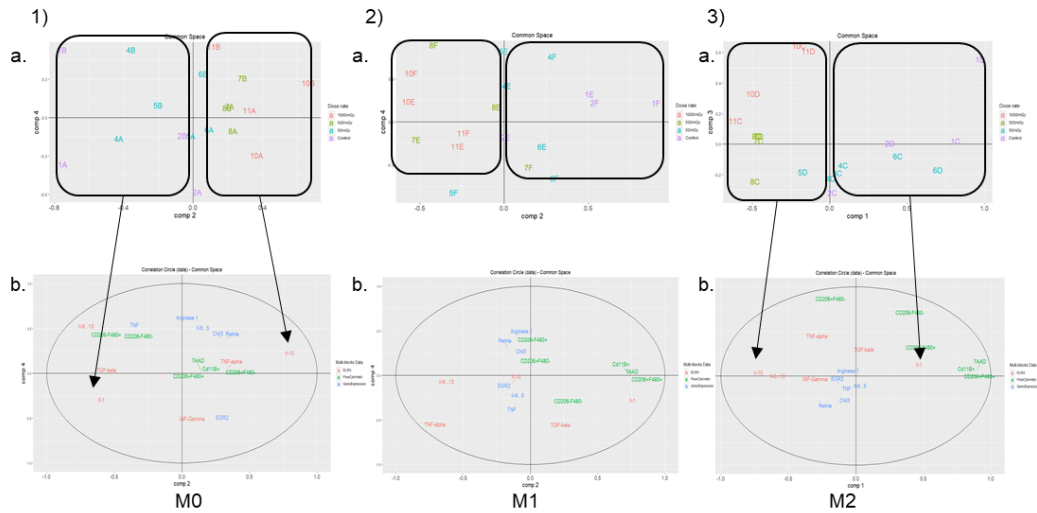


Fig 3. **Effects of LDIR in cytokin secretion, genic expression and immune phenotype of primary polarized macrophages *in vitro*.** Supernatant cytokin concentration, cells mRNA, and percentage of F4/80+CD206± of M0 (Fig.3-1), M1 (Fig.3-2) and M2 (Fig.3-3) macrophages were compiled and analysed into RGCCA analysis 24 hours following γ radiation. Results are presented as (a) sample space associated with the dimensions 2 and 4 of the superblock. Mice are marked according to the irradiation dose (Control, 0.05 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy) and (b) variables space associated with the dimensions 2 and 4 of the superblock show in 24 hours after irradiation.

LMDIR decreased circulating Ly6C^{High} monocytes at 24 hours, and increased Ly6C^{High} and Ly6C^{Low} at 10 days.

Ly6C^{High} “inflammatory monocytes” are dominant in the inflammatory response, and give rise to M1 macrophages in opposition to Ly6C^{Low} “patrolling monocytes”, giving rise to M2 macrophages (Tacke et al. 2007). We previously showed a reduction of circulating Ly6C^{High} monocytes with LMDIR with a lower dose rate in ApoE^(-/-) mice with no difference in Ly6C^{Low} subtypes. We next questioned whether increased M2 type phenotype and function with LMDIR was the consequence of blood Ly6C-expressing monocytes.

Flow cytometry data indicated a regulation of blood Ly6C-expressing monocytes (among CD11b and CD115+ cells) over time: Ly6C^{High} were significantly decreased at 1 Gy by 4 folds at 24 hours, increased by 3 folds at 10 days, and no difference at 100 days, as compared to non-irradiated controls. (Fig. 4A). For Ly6C^{Low} population, a significant 5 fold increase was detected at 1 Gy only at 10 days (Fig. 4B).

Figure 4

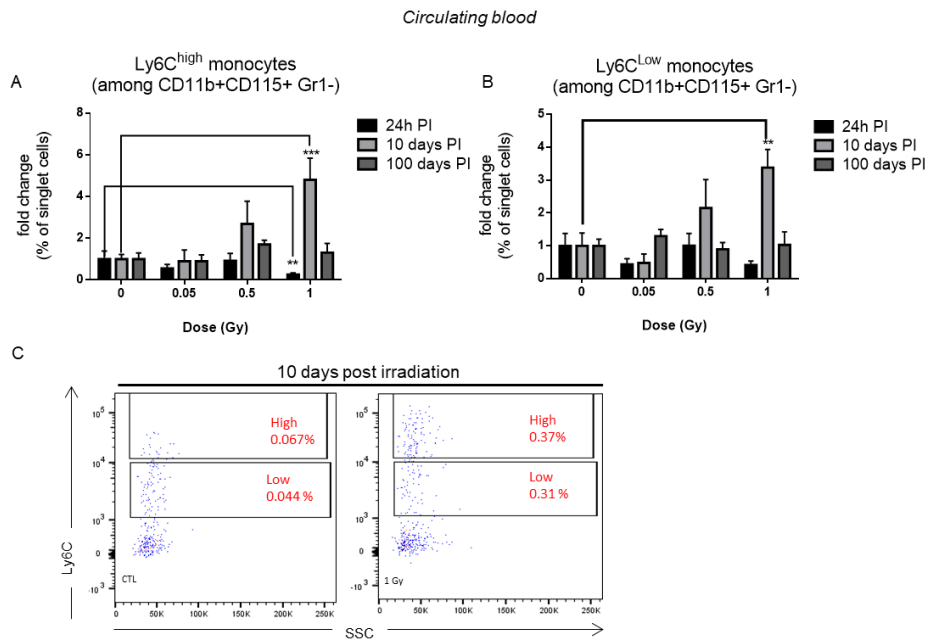


Fig 4. Ly6C^{high} proportions in blood are decreased 24h PI and increased 10 days PI after exposure to LDIR. Monocyte subsets were identified by flow cytometry in circulating blood of ApoE^{-/-} exposed to 0.05, 0.5 and 1 Gy of γ radiation and led to rest 24 hours, 10 days and 100 days. A: fold change relative to control bar graph Ly6C-High and low subsets (among CD11b+CD115+Gr1- monocytic population). B: representative dotplots of controls (CTL) and 1 Gy dose. C: representative dotplots of controls (CTL) and 1 Gy dose. n=5 to 8 animals per group. *p<0,05, **p<0,01.

Spleen can be a site of extramedullary hematopoiesis and has been shown to be a monocytes reservoir (Swirski et al. 2009) and a source of inflammatory Ly6C^{High} monocytes infiltrating atherosclerotic lesions (Robbins et al. 2012). In addition, we analyzed splenic Ly6C-expressing monocytes by flow cytometry.

10 days upon irradiation, 0.5 Gy induced a 3.33 fold decrease in splenic Ly6C^{High} as compared to non-irradiated controls (Fig. 5A), with no changes in Ly6C^{Low} proportions. Ly6C^{Low} were increased by 3 folds at 0.05 and 1Gy upon 100 days of irradiation. (Fig. 5B).

Figure 5

Spleen

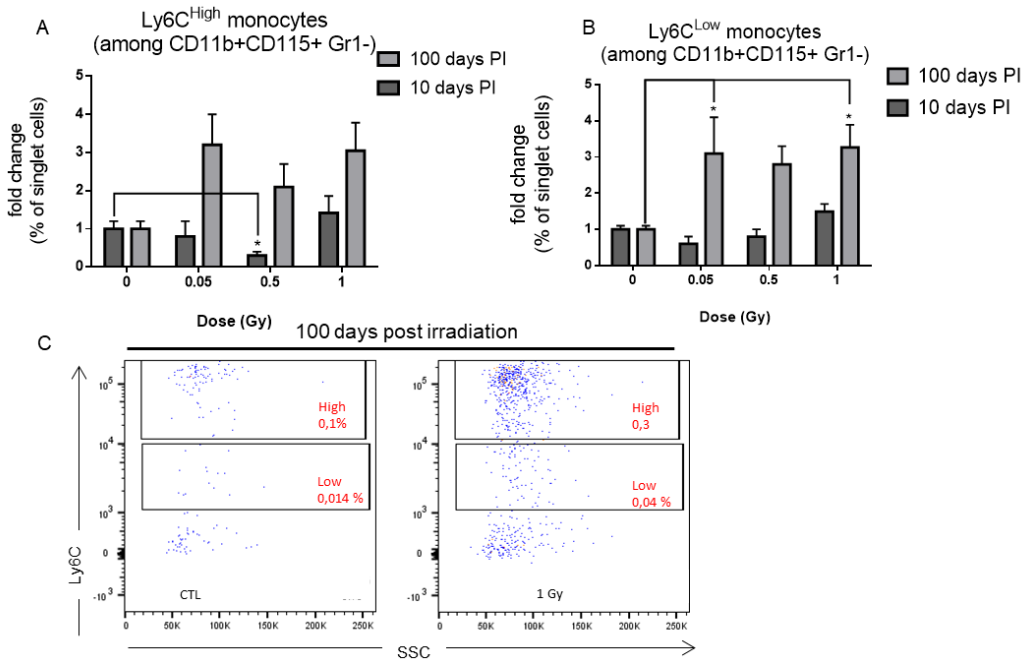


Fig 5. Low to moderate doses of ionizing radiation triggers a decrease in Ly6C^{High} proportions after 10 days, and an increase in Ly6C^{Low} proportions after 100 days PI in spleen. Monocyte subsets were identified by flow cytometry in spleen of ApoE^{-/-} exposed to 0.05, 0.5 and 1 Gy of γ radiation and led to rest 10 days and 100 days. A: fold change relative to control bar graph Ly6C-High and low subsets (among CD11b+CD115+Gr1- monocytic population). B: representative dotplots of controls (CTL) and 1 Gy dose. C: fold change relative to control bar graph CCR2- subsets (among CD11b+Gr1- monocytic population). D: representative dotplots of controls (CTL) and 1 Gy dose. n=5 to 8 animals per group. *p<0,05, **p<0,01.

LMDIR decreased plaque CD68-expressing macrophages without affecting size and stability at long term.

We next questioned if short term observed regulations of monocytes and macrophages by LMDIR lead later on to different plaque phenotype in terms of size and composition.

Oil red O staining revealed no differences in atherosclerotic lesion size and lipid contents between groups at day 100 upon exposure (Fig.6). Regarding plaque composition, collagen and smooth muscle cell (α -SMA) contents were also equal between groups (Fig 7). Suggesting that LMDIR had no effect on plaque size and stability.

Figure 6

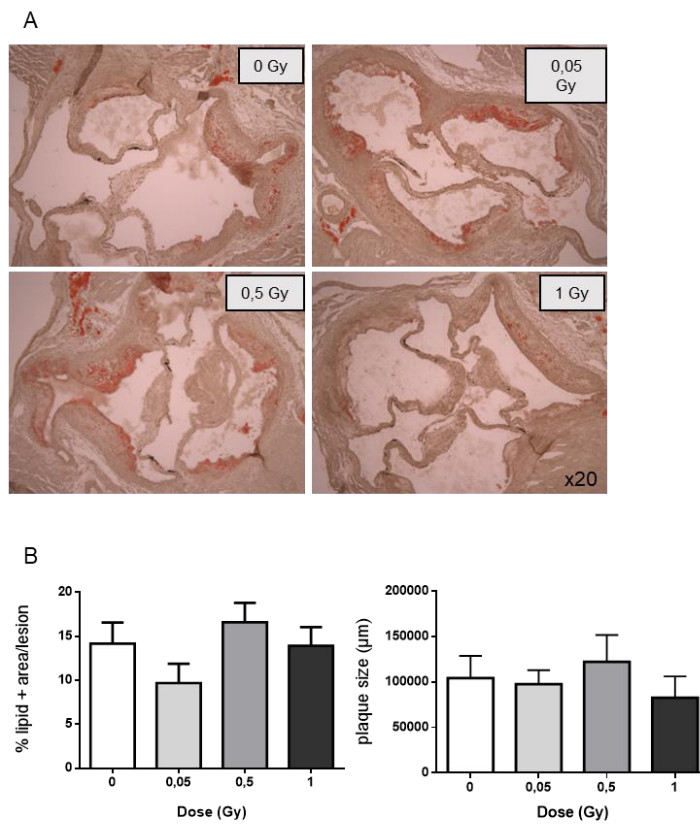
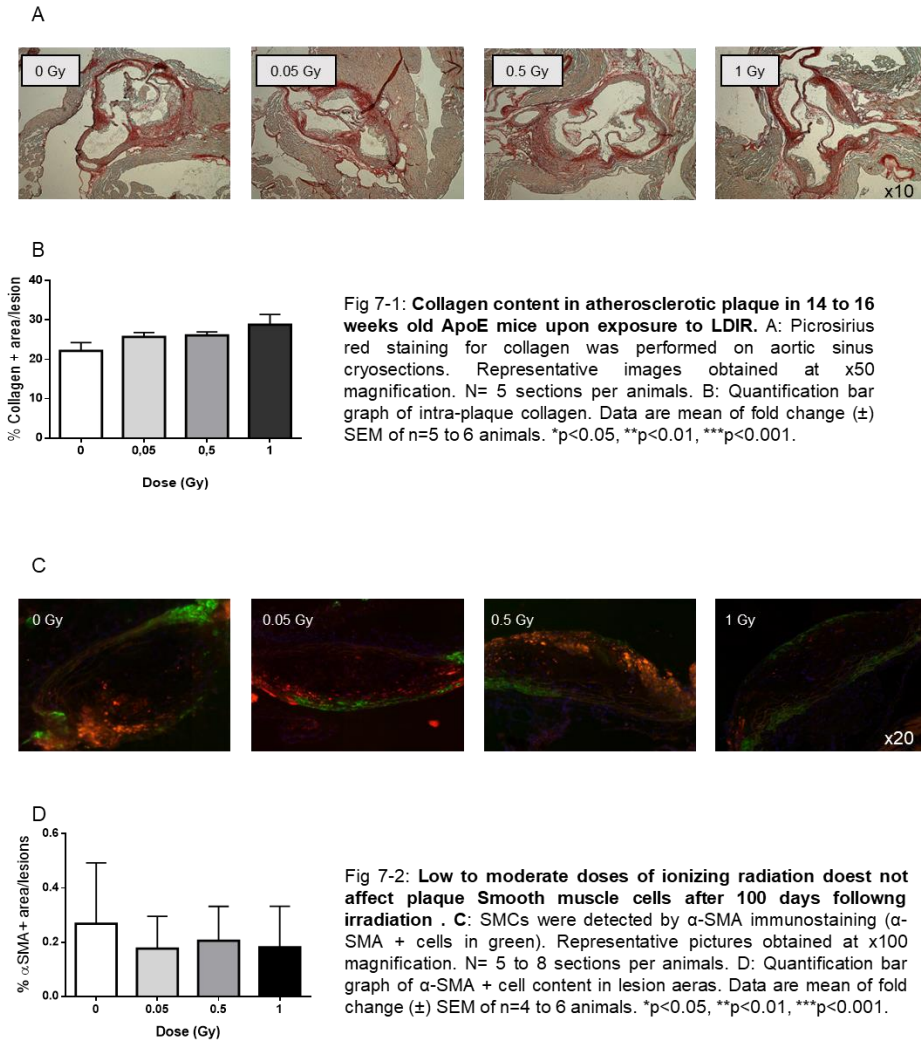


Fig 6: Lipid lesions in atherosclerotic plaque in 14 to 16 weeks old ApoE mice after exposure to LDIR. A: Lipid staining with was performed on aortic sinus cryosections. Representative picture obtained at x100 magnification. N= 5 sections per animals. B: Quantification bar graph of collagen intra-plaque. Data are mean of fold change (\pm) SEM of n=5 to 6 animals. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 7



In contrast, plaque CD68+ macrophages indicated a linear dose dependent decrease from 12 to 1.5%, becoming significant at 1Gy when compared to non-exposed control mice. (Fig. 8) No difference in plaque CD3+ T cells was observed between groups. (Fig.9). These results suggest that LMDIR reduces plaque inflammation at long term exposure essentially through regulation of macrophages.

Figure 8

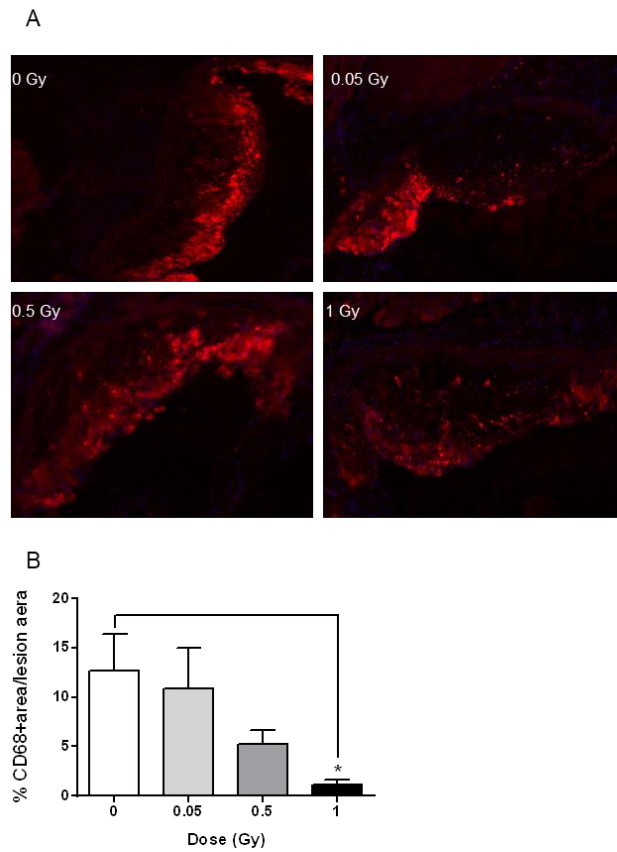


Fig 8: Exposure to 1 Gy of γ radiation reduces macrophages content in atheromatous plaque after 100 days. A: Macrophages were detected by CD68 immunostaining (CD68+ cells in red, nuclei in blue). Representative pictures obtained at x100 magnification. N= 5 to 8 sections per animals. B: Quantification bar graph of CD68+ cell content in lesion aeras. Data are mean of fold change (\pm) SEM of n=4 to 6 animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 9

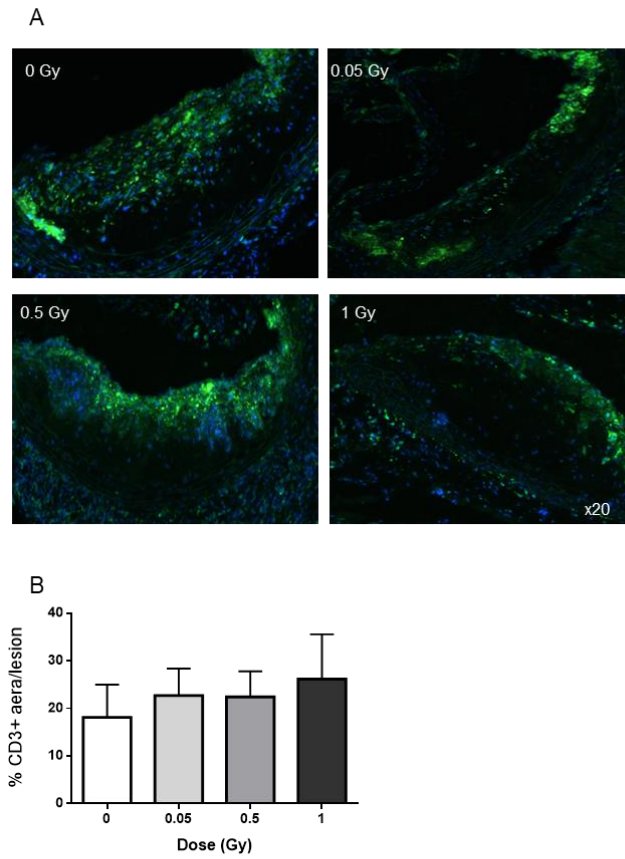


Fig 9: **Low to moderate doses of ionizing radiation does not modify lymphocyte content in atheromatous plaque** . A: Lymphocytes were detected by CD3 immunostaining (CD3+ cells in green, nuclei in blue). Representative pictures obtained at x100 magnification. N= 5 to 8 sections per animals. B: Quantification bar graph of CD3+ cell content in lesion aeras. Data are mean of fold change (\pm) SEM of n=5 to 6 animals. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Discussion

In this study, we evaluated the effects of LMDIR on macrophages phenotype and function at short term irradiation in atheroprone ApoE^(-/-) mice. We also assessed the potential consequences on atherosclerotic plaques at long term irradiation. We found that at short term, moderate doses favored an anti-inflammatory M2 type response, associated with a decrease of pro-inflammatory CD68-expressing macrophages within the plaque at long term.

Macrophages can be polarized *In vitro* into two separate types: classically activated M1 macrophages, polarized by LPS or INF- γ . They mediate the defense of the host against a wide range of pathogens, and participate in several chronic inflammatory diseases (Murray et Wynn 2011) including atherosclerosis. Alternatively, activated M2 macrophages, polarized by IL-4, they have anti-inflammatory functions, secrete IL-10 and TGF β and are involved mainly in wound healing (Ferrante et Leibovich 2012; Sica et Mantovani 2012; Kiefer et al. 2001).

The present study showed that LMDIR led to an increase of specific genes encoding for M2 macrophage markers, such as Egr-2, Arg-1, Chil-3 and Retnla in non-polarized M0 and M2 polarized macrophages. They all were upregulated at 1Gy and Chil-3 and Retnla were also significantly upregulated at lower doses. IL-4 not only drives M2 polarization, but is also an enhancer of M2 markers (Veremeyko et al. 2018; Martinez, Helming, et Gordon 2009). LMDIR could facilitate the role of IL-4 in upregulating genic expression of M2 markers. In addition, Egr-2, has been shown to control inflammation by regulating B and T lymphocyte responses and by preventing release of pro-inflammatory cytokines (Li et al. 2012). It has been shown that knock down of Egr-2 decreased the expression of Arg-1, Retnla and Chil-3 (Veremeyko et al. 2018). Thus, enhanced expression of Egr-2 by LMDIR could have stimulated the upregulation of the other M2 markers.

Interestingly, upregulation of mRNA levels of M2 markers upon exposure to LMDIR was associated with enhanced secretion of IL-10 by these cells. This suggests that moderate doses potentiate anti-inflammatory properties of M2 macrophages. In addition, RGCCA analysis correlated enhanced secretion of IL-10 with a higher percentage of CD11b+F4/80-CD206+ with M2 macrophages exposed to 0.5 and 1Gy. CD206 is a transmembrane glycoprotein considered as a M2 macrophage marker (Porcheray et al. 2005; Murray et al. 2014b) and is known to be upregulated by IL-10 (Svensson et al. 2011). One could hypothesize that LMDIR enhances anti-inflammatory cytokine secretion, leading to increase expression of CD206 on macrophages cell membrane. However, literature does not point a stimulating role of IL-10 in gene expression of M2 markers mentioned above, and Egr-2 has the property to inhibit IL-10 (Veremeyko et al. 2018) thus LMDIR could impact both cytokine secretion and gene expression in an independent manner.

In other studies, macrophages derived from bone marrow of C57/Bl6 irradiated mice also favored an anti-inflammatory profile, with an enhancement of M2 related gene expression and an increase of the expression of Arg-1 in tissues (Coates et al. 2008). However, these effects were obtained with higher dose (4 Gy) than what we used and were surprisingly similar. More recently, Wunderlich et al (Wunderlich et al. 2015) exposed macrophages derived from peritoneal cells to low doses of X-rays, and found that at 0.5Gy, M1 types secreted higher levels of TGF- β and lower levels of IL-1 β . Taking together these elements are in favor of an anti-inflammatory response induced by LMDIR on macrophages. In the context of atherosclerosis, macrophage polarization into an M2-type could have a potential athero-protective effect, by reducing inflammation.

Regarding blood monocytic populations, Ly6C^{High} pro-inflammatory monocytes were severely affected at 1Gy exposure, however the time lapse upon irradiation seems to modulate this effect. A clear decrease was

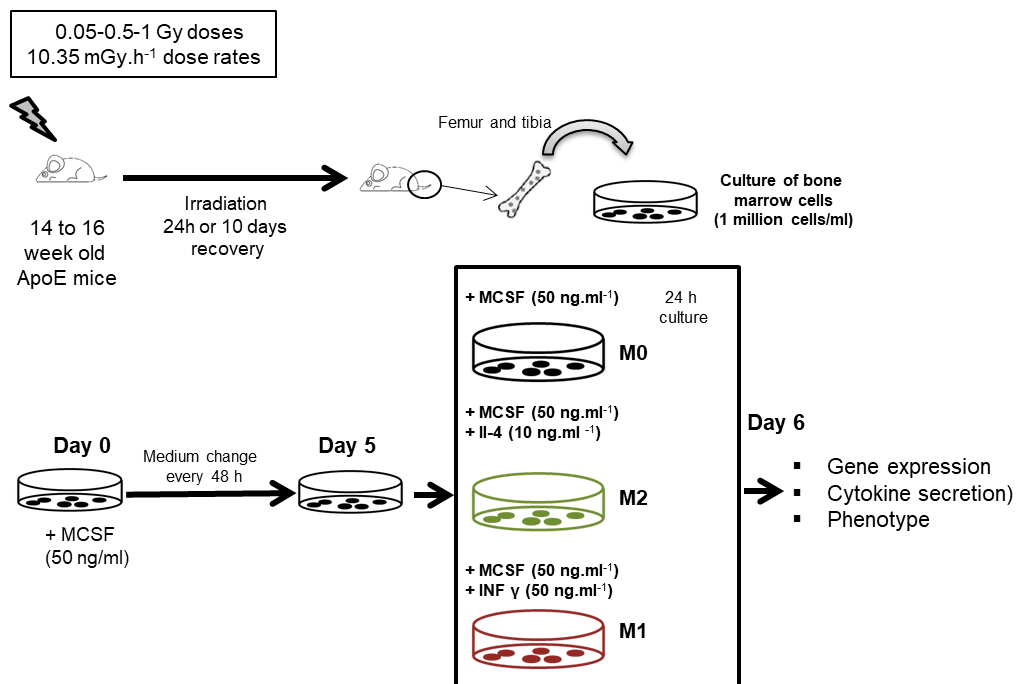
observed at 24h post irradiation and a 4 fold increase at 10 days post irradiation as compared to control. This could suggest an increased proliferation of these subsets few days after irradiation since no changes were observed in blood 100 days post irradiation. Similarly, to Ly6C^{High}, Patrolling Ly6C^{Low} monocytes were also increased 5-fold at 1Gy at 10 days trend, indicating that irradiation does not appear to affect monocyte conversion into Ly6C^{Low} monocytes.

Interestingly, splenic ly6C^{Low} subsets were significantly increased only at 100 days upon irradiation in a nonlinear manner at 0.05 and 1 Gy compared to control. This profile is different from blood monocytes. Since spleen could be an important source of monocytes during inflammation and they could be recruited from there to the plaque (Swirski et al. 2009); increased blood Ly6C- expressing monocytes could be stocked in the spleen. Fate mapping or adoptive transfer techniques could be useful in tracking Ly6C-expressing cells upon exposure to LMDIR.

One of the main questions was long term effects of LMDIR on atherosclerotic plaque development, stability and composition. Plaques are characterized by an increase in the proliferation and the uptake of oxidized-LDL of inflammatory macrophages, ending up with the formation of necrotic cores. This phenomenon is associated with decreased plaque smooth muscle cell and collagen contents reflecting decreased plaque stability that could lead to plaque rupture (Virmani et al. 2000; 2005). Our results did not show any differences in plaque size, lipid, collagen and smooth muscle cell contents between LMDIR exposed and non-exposed animals at 100 days post irradiation. Indicating that long term exposure to LMDIR does not affect plaque morphology and stability. Interestingly, immunofluorescent staining showed a significant reduction of plaque CD68-expressing cells at 1Gy exposure. CD68 is one of the main scavenger receptors expressed by macrophages and synthetic smooth muscle cells involved in the uptake of LDL. The pro-atherogenic role of CD68 has been largely reported in the literature (Basatemur et al. 2019; Wang et al. 2019). Since plaque smooth muscle cell contents were equal between groups and that an increase of M2 type macrophage function was observed at short term exposure; we believe that decreased CD68-expressing cells are pro-inflammatory macrophages. Suggesting that LMDIR activates rapidly M2 type macrophage anti-inflammatory function leading later on to a reduction of M1 type pro-inflammatory macrophages within atherosclerotic plaques.

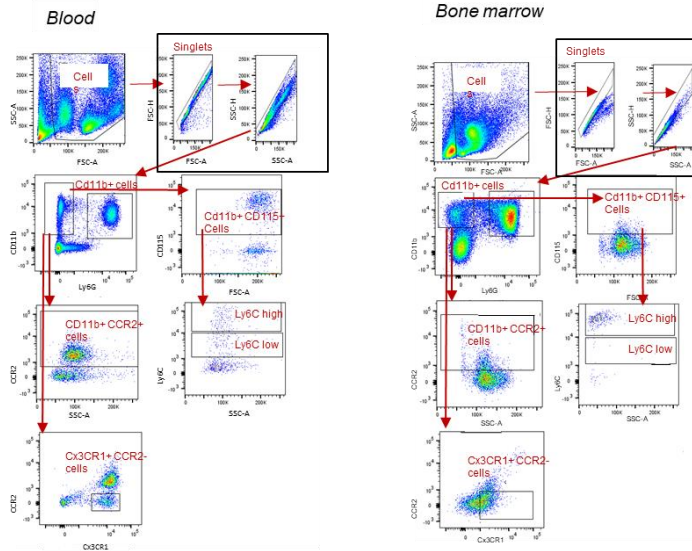
The present results indicate that exposure of an atheroprone mouse model to LMDIR induces short- and long-term effects on immune response. LMDIR at short term regulates monocyte and macrophage function toward an anti-inflammatory phenotype leading to the development of less inflammatory plaques. In accordance with previous data (Le Gallic et al. 2015b; Ebrahimian et al. 2017; Mitchel et al. 2011; Mancuso et al. 2015), these results once again confirm the atheroprotective role of moderate doses of ionizing radiation.

Appendices

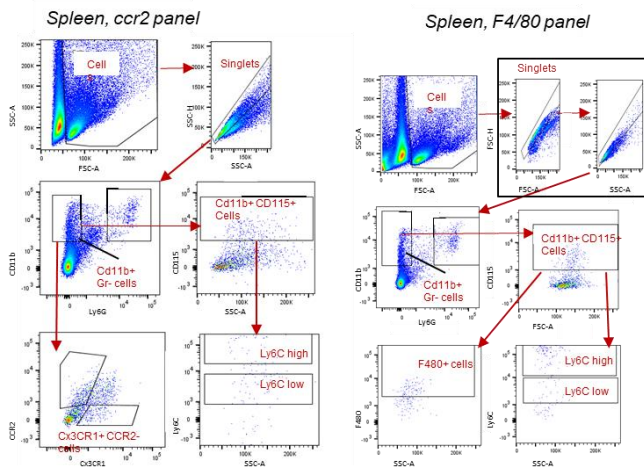


Online Figure 1: Outline of the irradiation protocol. 14-16 weeks old ApoE^{-/-} mice were exposed to low to moderate doses of γ ionizing radiation (0.05, 0.5 and 1 Gy dose). They were sacrificed 24 hours or day 10 post-irradiation, Bone marrow from femur and tibia were cultivated for cell culture with 50 ng.ml⁻¹ of MCSF for 5 days then Il-4 (10 ng.ml⁻¹) was added for M2 macrophage polarisation and INF γ (50 ng.ml⁻¹) for M1 polarisation during 24 hours. flow cytometry and qPCR were realised on cells and ELISA assay were performed on cell supernatant.

Online figure 2

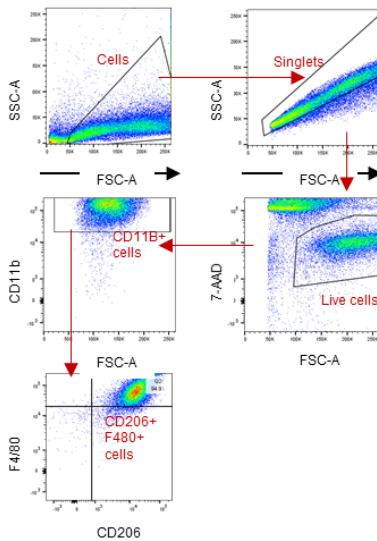


Online Figure 2: Gating strategy to identify monocyte subsets in Bone marrow, circulating blood and spleen. Gating was first performed on forward versus side scatter (FSC vs SSC), cell debris and doublets were removed. Among monocytes identified as CD11B+Gr-CD115+ Ly6C High and Low subsets were detected. And among CD11B+Gr- cells, Cx3CR1+CCR2+/- cells were detected.



Online figure 3

Bone marrow derived macrophages



Online Figure 3: Gating strategy to identify macrophage subsets in Bone marrow Derived Macrophage cells. Gating was first performed on forward versus side scatter (FSC vs SSC), cell debris and doublets were removed. Among macrophage CD11B+F4/80+ cells, CD206 positive and negative cells were detected.

Bibliography

- Auffray, Cedric, Darin Fogg, Meriem Garfa, Gaelle Elain, Olivier Join-Lambert, Samer Kayal, Sabine Sarnacki, Ana Cumano, Gregoire Lauvau, et Frederic Geissmann. 2007. « Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior ». *Science* 317 (5838): 666–670.
- Basatemur, Gemma L, Helle F Jørgensen, Murray CH Clarke, Martin R Bennett, et Ziad Mallat. 2019. « Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis ». *Nature reviews cardiology*, 1–18.
- Baselet, Bjorn, Charlotte Rombouts, Abderrafi Mohammed Benotmane, Sarah Baatout, et An Aerts. 2016. « Cardiovascular diseases related to ionizing radiation: The risk of low-dose exposure (Review) ». *International Journal of Molecular Medicine* 38 (6): 1623-41.
- Bashar, Khalid, Donagh Healy, Mary Clarke-Moloney, Paul Burke, Eamon Kavanagh, et Stewart-Redmond Walsh. 2014. « Effects of neck radiation therapy on extra-cranial carotid arteries atherosclerosis disease prevalence: systematic review and a meta-analysis ». *PloS one* 9 (10): e110389.
- Boivin, Jean-François, George B Hutchison, Jay H Lubin, et Peter Mauch. 1992. « Coronary artery disease mortality in patients treated for Hodgkin's disease ». *Cancer* 69 (5): 1241–1247.
- Brunet, Alexandre, Manon LeBel, Benoit Egarnes, Carine Paquet-Bouchard, Anne-Julie Lessard, Jacques P Brown, et Jean Gosselin. 2016. « NR4A1-dependent Ly6Clow monocytes contribute to reducing joint inflammation in arthritic mice through Treg cells ». *European journal of immunology* 46 (12): 2789–2800.
- Coates, Philip J, Jana K Rundle, Sally A Lorimore, et Eric G Wright. 2008. « Indirect macrophage responses to ionizing radiation: implications for genotype-dependent bystander signaling ». *Cancer research* 68 (2): 450–456.
- Ebrahimian, T. G., L. Beugnies, J. Surette, N. Priest, Y. Gueguen, C. Gloaguen, M. Benderitter, J. R. Jourdain, et K. Tack. 2017. « Chronic Exposure to External Low-Dose Gamma Radiation Induces an Increase in Anti-inflammatory and Anti-oxidative Parameters Resulting in Atherosclerotic Plaque Size Reduction in ApoE–/– Mice ». *Radiation research* 189 (2): 187-96.
- Ferrante, Christopher J, et Samuel Joseph Leibovich. 2012. « Regulation of macrophage polarization and wound healing ». *Advances in wound care* 1 (1): 10–16.
- Garali, Imene, Isaac M Adanyeguh, Farid Ichou, Vincent Perlberg, Alexandre Seyer, Benoit Colsch, Ivan Moszer, et al. 2018. « A strategy for multimodal data integration: application to biomarkers identification in spinocerebellar ataxia ». *Briefings in bioinformatics* 19 (6): 1356–1369.
- Geissmann, Frederic, Steffen Jung, et Dan R Littman. 2003. « Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties ». *Immunity* 19 (1): 71–82.
- Gister\aa, Anton, et Göran K Hansson. 2017. « The immunology of atherosclerosis ». *Nature Reviews Nephrology* 13 (6): 368.

Hildebrandt, G, A Radlingmayr, S Rosenthal, R Rothe, J Jahns, M Hindemith, F Rödel, et F Kamprad. 2003. « Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats ». *International journal of radiation biology* 79 (12): 993–1001.

Hoving, Saske, Sylvia Heeneman, Marion JJ Gijbels, Johannes AM te Poele, Nicola S Russell, Mat JAP Daemen, et Fiona A Stewart. 2008. « 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* 71 (3): 848–857.

Joven, Jorge, Anna Rull, Natàlia Ferré, Joan Carles Escolà-Gil, Judit Marsillach, Blai Coll, Carlos Alonso-Villaverde, Gerard Aragones, Joan Claria, et Jordi Camps. 2007. « The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain ». *Atherosclerosis* 195 (2): e85–e92.

Juniku, Nderim, Oliver Micke, M Heinrich Seegenschmiedt, et Ralph Muecke. 2019. « Radiotherapy for painful benign skeletal disorders ». *Strahlentherapie und Onkologie* 195 (12): 1068–1073.

Kamiya, Kenji, Kotaro Ozasa, Suminori Akiba, Ohstura Niwa, Kazunori Kodama, Noboru Takamura, Elena K. Zaharieva, Yuko Kimura, et Richard Wakeford. 2015. « Long-term effects of radiation exposure on health ». *The Lancet* 386 (9992): 469-78.

Kiefer, Reinhard, Bernd C Kieseier, Guido Stoll, et Hans-Peter Hartung. 2001. « The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system ». *Progress in neurobiology* 64 (2): 109–127.

Le Gallic, Clélia, Yohann Phalente, Line Manens, Isabelle Dublineau, Marc Benderitter, Yann Gueguen, Stephanie Lehoux, et Teni G. Ebrahimian. 2015a. « 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.

———. 2015b. « Chronic Internal Exposure to Low Dose 137Cs Induces Positive Impact on the Stability of Atherosclerotic Plaques by Reducing Inflammation in ApoE^{-/-} Mice ». Édité par Esther Lutgens. *PLOS ONE* 10 (6): e0128539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128539>.

Li, Suling, Tizong Miao, Meera Sebastian, Punamdip Bhullar, Emma Ghaffari, Mengya Liu, Alistair LJ Symonds, et Ping Wang. 2012. « The transcription factors Egr2 and Egr3 are essential for the control of inflammation and antigen-induced proliferation of B and T cells ». *Immunity* 37 (4): 685–696.

Lödermann, Barbara, Roland Wunderlich, Silke Frey, Christine Schorn, Sonja Stangl, Franz Rödel, Ludwig Keilholz, Rainer Fietkau, Udo S Gaipl, et Benjamin Frey. 2012. « Low dose ionising radiation leads to a NF- κ B dependent decreased secretion of active IL-1 β by activated macrophages with a discontinuous dose-dependency ». *International journal of radiation biology*.

Mancuso, Mariateresa, Emanuela Pasquali, Ignacia Braga-Tanaka III, Satoshi Tanaka, Alessandro Pannicelli, Paola Giardullo, Simonetta Pazzaglia, Soile Tapio, Michael J. Atkinson, et Anna Saran. 2015. « Acceleration of atherogenesis in ApoE^{-/-} mice exposed to acute or low-dose-rate ionizing radiation ». *Oncotarget* 6 (31): 31263.

Martinez, Fernando O, et Siamon Gordon. 2014. « The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment ». *F1000prime reports* 6.

- Martinez, Fernando O, Laura Helming, et Siamon Gordon. 2009. « Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective ». *Annual review of immunology* 27: 451–483.
- McGale, Paul, Sarah C Darby, Per Hall, Jan Adolfsson, Nils-Olof Bengtsson, Anna M Bennet, Tommy Fornander, et al. 2011. « Incidence of heart disease in 35,000 women treated with radiotherapy for breast cancer in Denmark and Sweden ». *Radiotherapy and Oncology* 100 (2): 167–175.
- Mitchel, R. E. J., M. Hasu, M. Bugden, H. Wyatt, M. P. Little, A. Gola, G. Hildebrandt, N. D. Priest, et S. C. Whitman. 2011. « Low-dose radiation exposure and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice ». *Radiation research* 175 (5): 665-76.
- Mulrooney, Daniel A, Gregory T Armstrong, Sujuan Huang, Kirsten K Ness, Matthew J Ehrhardt, Vijaya M Joshi, Juan Carlos Plana, et al. 2016. « Cardiac outcomes in adult survivors of Childhood cancer exposed to cardiotoxic therapy: a cross-sectional study ». *Annals of internal medicine* 164 (2): 93–101.
- Murray, Peter J, Judith E Allen, Subhra K Biswas, Edward A Fisher, Derek W Gilroy, Sergij Goerd, Siamon Gordon, et al. 2014a. « Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines ». *Immunity* 41 (1): 14–20.
- Murray, Peter J, et Thomas A Wynn. 2011. « Protective and pathogenic functions of macrophage subsets ». *Nature reviews immunology* 11 (11): 723–737.
- Porcheray, F, S Viaud, A-C Rimaniol, C Leone, B Samah, N Dereuddre-Bosquet, D Dormont, et G Gras. 2005. « Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation ». *Clinical & Experimental Immunology* 142 (3): 481–489.
- Robbins, Clinton S, Aleksey Chudnovskiy, Philipp J Rauch, Jose-Luiz Figueiredo, Yoshiko Iwamoto, Rostic Gorbatov, Martin Etzrodt, et al. 2012. « Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6Chigh monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions ». *Circulation* 125 (2): 364–374.
- Rödel, F, M Hantschel, G Hildebrandt, S Schultze-Mosgau, C Rödel, M Herrmann, R Sauer, et RE Voll. 2004. « Dose-dependent biphasic induction and transcriptional activity of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in EA. hy. 926 endothelial cells after low-dose X-irradiation ». *International journal of radiation biology* 80 (2): 115–123.
- Rödel, Franz, Franz Rödel, Ludwig Keilholz, Franz Rödel, Ludwig Keilholz, Martin Herrmann, Christian Weiss, et al. 2009. « Activator protein 1 shows a biphasic induction and transcriptional activity after low dose X-irradiation in EA. hy. 926 endothelial cells: Brief definite report ». *Autoimmunity* 42 (4): 343–345.
- Rödel, Franz, Ulrich Schaller, Stefan Schultze-Mosgau, Horst-Ulrich Beuscher, Ludwig Keilholz, Martin Herrmann, Reinhard Voll, Rolf Sauer, et Guido Hildebrandt. 2004. « The induction of TGF- β 1 and NF- κ B parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation ». *Strahlentherapie und Onkologie* 180 (4): 194–200.
- Schaue, D., Brian Marples, et K. R. Trott. 2002. « The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages ». *International journal of radiation biology* 78 (7): 567-76.
- Schaue, Dörthe, Jutta Jahns, Guido Hildebrandt, et Klaus-Rüdiger Trott. 2005. « Radiation treatment of acute inflammation in mice ». *International journal of radiation biology* 81 (9): 657-67.

- Shimizu, Yukiko, Kazunori Kodama, Nobuo Nishi, Fumiyoshi Kasagi, Akihiko Suyama, Midori Soda, Eric J Grant, et al. 2010. « Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003 ». *Bmj* 340: b5349.
- Sica, Antonio, et Alberto Mantovani. 2012. « Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas ». *The Journal of clinical investigation* 122 (3): 787–795.
- Song, Li, Cynthia Leung, Christian Schindler, et others. 2001. « Lymphocytes are important in early atherosclerosis ». *The Journal of clinical investigation* 108 (2): 251–259.
- Svensson, Judit, Maria C Jenmalm, Andreas Matussek, Robert Geffers, Göran Berg, et Jan Ernerudh. 2011. « Macrophages at the fetal–maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10 ». *The Journal of Immunology* 187 (7): 3671–3682.
- Swirski, Filip K, Peter Libby, Elena Aikawa, Pilar Alcaide, F William Luscinskas, Ralph Weissleder, Mikael J Pittet, et others. 2007. « Ly-6C hi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata ». *The Journal of clinical investigation* 117 (1): 195–205.
- Swirski, Filip K, Matthias Nahrendorf, Martin Etzrodt, Moritz Wildgruber, Virna Cortez-Retamozo, Peter Panizzi, Jose-Luiz Figueiredo, et al. 2009. « Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites ». *Science* 325 (5940): 612–616.
- Tabas, Ira, et Andrew H. Lichtman. 2017. « Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis ». *Immunity* 47 (4): 621-34.
- Tacke, Frank, David Alvarez, Theodore J Kaplan, Claudia Jakubzick, Rainer Spanbroek, Jaime Llodra, Alexandre Garin, et al. 2007. « Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques ». *The Journal of clinical investigation* 117 (1): 185–194.
- Vaiserman, Alexander, Alexander Koliada, Oksana Zabuga, et Yehoshua Socol. 2018. « Health impacts of low-dose ionizing radiation: current scientific debates and regulatory issues ». *Dose-Response* 16 (3): 1559325818796331.
- Veremeyko, Tatyana, Amanda WY Yung, Daniel C Anthony, Tatyana Strelakova, et Eugene D Ponomarev. 2018. « Early growth response gene-2 is essential for M1 and M2 macrophage activation and plasticity by modulation of the transcription factor CEBP β ». *Frontiers in Immunology* 9: 2515.
- Virmani, Renu, Frank D Kolodgie, Allen P Burke, Andrew Farb, et Stephen M Schwartz. 2000. « Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20 (5): 1262–1275.
- Virmani, Renu, Frank D Kolodgie, Allen P Burke, Alope V Finn, Herman K Gold, Thomas N Tulenko, Steven P Wrenn, et Jagat Narula. 2005. « Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25 (10): 2054–2061.
- Wang, Ying, Joshua A Dubland, Sima Allahverdian, Enyinnaya Asonye, Basak Sahin, Jen Erh Jaw, Don D Sin, Michael A Seidman, Nicholas J Leeper, et Gordon A Francis. 2019. « Smooth muscle cells contribute the majority

of foam cells in ApoE (apolipoprotein E)-deficient mouse atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 39 (5): 876–887.

Westerhuis, Johan A, Theodora Kourti, et John F MacGregor. 1998. « Analysis of multiblock and hierarchical PCA and PLS models ». *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society* 12 (5): 301–321.

Wunderlich, R, A Ernst, F Rödel, R Fietkau, O Ott, K Lauber, B Frey, et US Gaipf. 2015. « 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 & Experimental Immunology* 179 (1): 50–61.

Yona, Simon, Ki-Wook Kim, Yochai Wolf, Alexander Mildner, Diana Varol, Michal Breker, Dalit Strauss-Ayali, et al. 2013. « Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis ». *Immunity* 38 (1): 79–91.

Ziegler-Heitbrock, Loems, Petronela Ancuta, Suzanne Crowe, Marc Dalod, Veronika Grau, Derek N Hart, Pieter JM Leenen, et al. 2010. « Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood ». *Blood* 116 (16): e74–e80.

III. Résultats complémentaires *in vitro*

1. Etude de transmigration et de motilité monocytaire

La figure ci-dessous présente les capacités des lignées de monocytes THP-1 à se diriger vers le chimio attractant à travers un insert poreux de 8 μm avec présence (figure 39.A) ou non (figure 39.B) d'un tapis endothélial sur l'insert, en fonction de la dose d'exposition et du temps de la latence post-irradiation. Il apparaît en figure A, une tendance générale à la hausse de la motilité des THP-1, néanmoins uniquement significative après 3 jours de latence post-irradiation avec une hausse du nombre de monocytes en abluminale pour l'ensemble des doses d'expositions (0.05, 0.5 et 1 Gy) ($p = 0.012$, $P = 0.025$, $p = 0.050$ respectivement) par rapport au contrôle non-exposé. Concernant la capacité des monocytes à transmigration à travers un insert poreux et la barrière endothéliale, il est observé de nouveau une hausse significative de la transmigration 3 jours après irradiation très importante (0.05, 0.5 et 1 Gy) ($p < 0.001$, $P = 0.018$, $p = 0.007$ respectivement). Cette tendance semble s'inverser 10 jours après l'irradiation mais elle n'est pas significative.

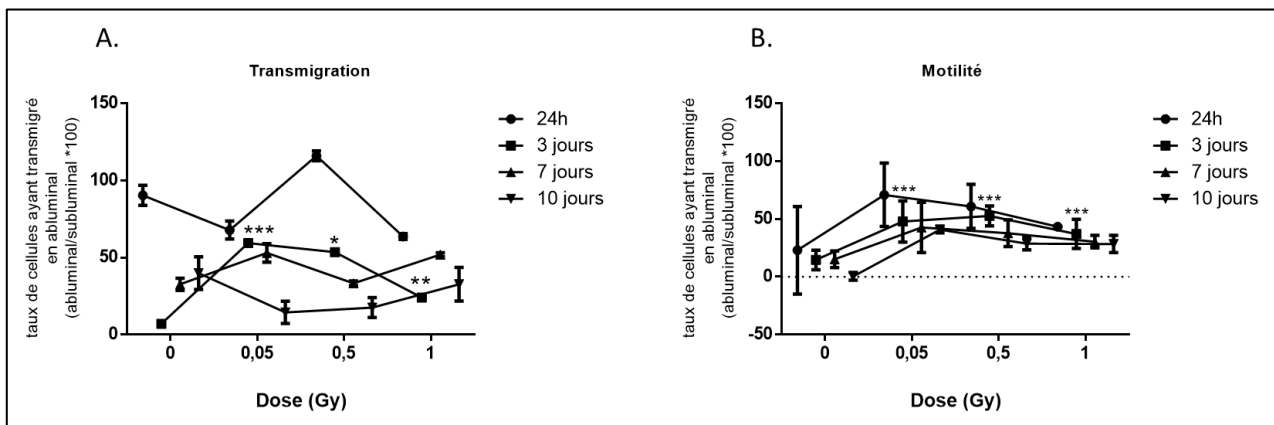


Figure 39 Quantification de la motilité et transmigration des THP-1 après exposition à des doses faibles et modérées de rayonnements ionisants en fonction du temps de latence post-irradiation. Des cultures de lignées monocytaires Thp-1 furent exposées en externe à des rayons γ puis déposées dans des inserts poreux (8 μm) afin de mimer leur capacité à migrer vers le chimio attractant MCP-1. A : capacité motile des Thp-1 à travers l'insert poreux sans tapis endothélial. B : capacité migratoire des THP-1 à travers l'insert poreux avec tapis endothélial Huvec. Les résultats sont exprimés comme le rapport de cellules en abluminal divisé par le nombre de cellules en luminal x 100 sous forme de nuages de points. N=4 à 6 flasques par doses et par temps post irradiation. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ par rapport au groupe contrôle non-irradié.

2. Etude des capacités de prolifération des progéniteurs myéloïdes

La figure ci-dessous représente le nombre de colonies formées à partir de progéniteurs myéloïdes provenant de souris ApoE^(-/-). Le nombre de colonies CFU-G est uniquement significativement impacté à 1 Gy, 10 jours après irradiation avec une diminution de 50 % du nombre de colonies par rapport au contrôle non-exposé (pvalue = 0.034) (Figure 40.C) . Le nombre CFU-GM est particulièrement affecté 24h après irradiation, ce nombre est presque doublé à la dose de 50 mGy (P = 0.011), et à l'inverse diminué de plus de moitié à 1 Gy (P = 0.001). Cette diminution à 1 Gy est maintenue dans le temps 10 jours après irradiation et aucune modification n'est détectée au bout de 20 jours PI. Enfin le nombre de CFU-M est abaissé à 1 Gy 10 (pvalue= 0.016) et 20 jours PI (pvalue= 0.006).

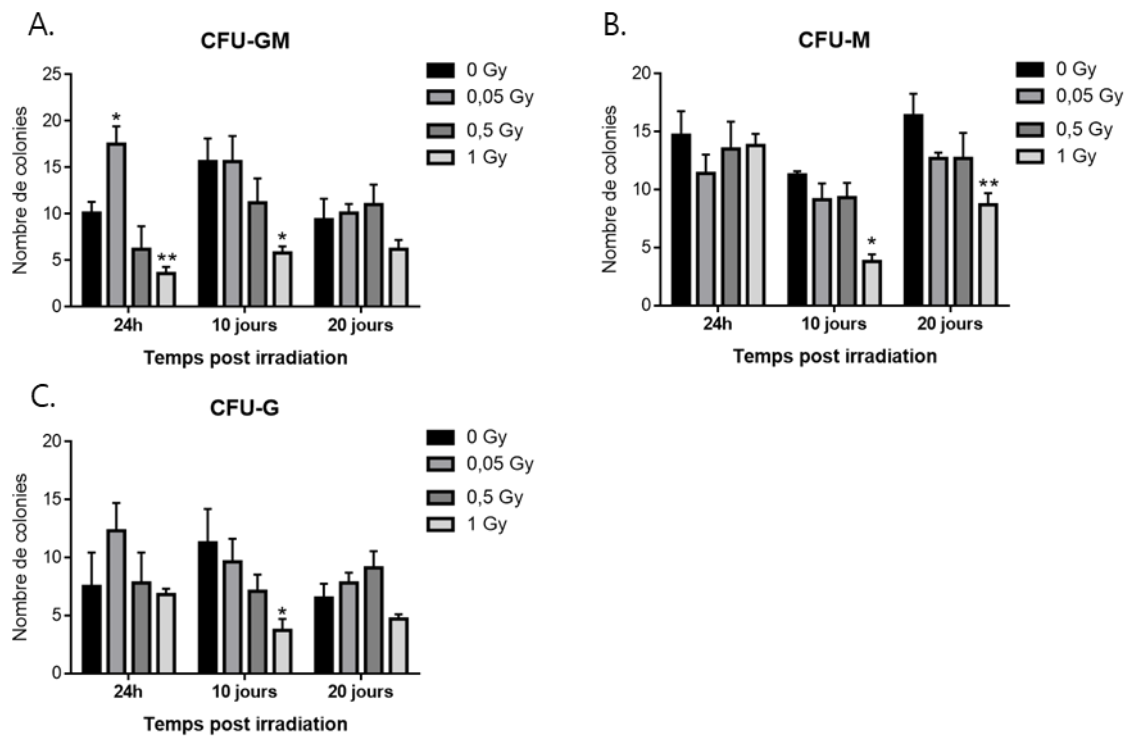


Figure 40 Nombres de colonies CFU-G (A), GM (B) et M (C) comptabilisés après exposition aux doses faibles et modérées de rayonnements ionisants et en fonction du temps de latence post-irradiation. Des souris ApoE^(-/-) prédisposées à l'athérosclérose ont été exposées par irradiation externe à des rayons γ (0.05, 0.5 et 1 Gy). Les cellules hématopoïétiques de moelle osseuse des animaux ont été mises en culture afin de faire proliférer des unités de colonies. Le nombre de ces colonies a été comptabilisé 11 jours après la mise en culture. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 par rapport au contrôle non-irradié.

Discussion

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

I. Effet sur les acteurs immunitaires impliqués dans l'athérosclérose

1. Monocytes

A. Circulation sanguine

Les monocytes Ly6C^{high} ont un rôle très important dans l'initiation de l'athérosclérose, principalement par leur capacité à transmigrer au travers de l'endothélium afin de se différencier en macrophages résidents et enclencher l'inflammation. D'autre part, les souris prédisposées à l'athérosclérose ApoE^(-/-) ont une concentration sanguine en monocytes Ly6C^{high} qui est accrue (Swirski et al. 2007). Dans notre étude, l'exposition de souris ApoE^(-/-) à des gammes de doses faibles à modérées de rayonnements ionisants a entraîné une diminution significative et constante à l'ensemble des doses, des monocytes Ly6C^{high} de la circulation sanguine. Ce phénomène a été aussi bien observé à faible débit de dose (1.4 mGy.h⁻¹) qu'à fort débit de dose (50 mGy.h⁻¹). Les effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur les populations monocytaires ont été relativement peu explorés dans un contexte d'athérosclérose. Afin de comprendre cette réponse, nous pouvons mentionner les travaux de Sharma, 2019 (Sharma et al. 2019) qui ont observé une diminution du nombre de monocytes dans la circulation sanguine après exposition aux rayons X à dose faible chez le rat, cependant les sous types monocytaires n'ont pas été explorés dans cette étude.

De par les propriétés des monocytes Ly6C^{high} et de leur action au niveau de la plaque d'athérosclérose, ces monocytes sont considérés comme des cellules prônant l'inflammation (Geissmann, Jung, et Littman 2003) et donc l'aggravation de l'athérosclérose (Swirski et al. 2007; Serbina et al. 2008). Une diminution de leur concentration sanguine à l'issue d'une exposition à des faibles doses de rayonnements ionisants peut donc s'interpréter comme un signe de modulation inflammatoire.

La réponse se manifeste par une baisse inflammatoire. Dans la mesure où les monocytes Ly6C^{high} sont à l'origine des macrophages M1 accumulant les LDL pour se différencier en cellules spumeuses, cette diminution provoquée par les faibles doses de rayonnements ionisants peut s'interpréter comme athéro-protecteur.

Ces travaux peuvent être comparés à la seconde étude que nous avons réalisée. En effet, l'analyse par immunophénotypage des populations monocytaires Ly6C^{high} et Ly6C^{low} auprès des animaux ApoE^(-/-) irradiés à des doses similaires a montré des résultats opposés à la première étude : les proportions de monocytes Ly6C^{high} étaient significativement augmentées dans le sang à la dose de 1 Gy par rapport au groupe contrôle, et cela, à la même durée de latence post-irradiation de 10 jours.

Ces résultats peuvent être ainsi discutés selon différents aspects :

Une des raisons que nous pouvons évoquer est la différence d'âge entre les animaux, les animaux de la seconde étude sont en effet deux fois plus âgés que pour la première étude. Or, dans ce modèle de prédisposition à

l'athérosclérose, l'âge est considéré comme un facteur aggravant. L'étude de Tonini, 2013 (Tonini et al. 2013) montre que l'effet de l'âge associé à une hypercholestérolémie provoque une hausse de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène, de dommages à l'ADN et de l'apoptose parmi les cellules mononucléaires de la moelle osseuse chez les souris ApoE^(-/-). D'autre part, Rauscher, 2003 (Rauscher et al. 2003) observe que les cellules progénitrices de la moelle osseuse s'épuisent avec l'âge, et ont une capacité amoindrie à réparer et rajeunir les artères, ce qui constitue un facteur aggravant pour l'athérosclérose.

L'ensemble de ces résultats suggère que, dans ce modèle de souris ApoE^(-/-) âgées de 14 à 16 semaines, l'athérosclérose a pu s'aggraver par une action du vieillissement conduisant à une inflammation accrue chez ces animaux. De plus le débit de dose appliqué lors de l'irradiation était 12,5 fois supérieur (10.35 mGy.min⁻¹ vs 50 mGy.h⁻¹). Ce débit de dose élevé sur un modèle avec une inflammation augmentée pourrait donc avoir entraîné un effet pro-inflammatoire dans ces conditions à la plus forte dose de 1 Gy, se traduisant par une augmentation de monocytes Ly6C^{High}.

De plus, il convient de rappeler que le phénotype des monocytes n'était pas identique entre les deux études. Ainsi les monocytes Ly6C^{high/low} de la première étude correspondait à un marquage Cd11+Ly6Gr-Ly6C^{+/-} et les monocytes de la seconde étude étaient identifiés comme Cd11+Ly6Gr-CD115+Ly6C^{+/-}. Une des raisons ayant guidé l'ajout de CD115, est que l'utilisation seule de CD11b pour identifier les monocytes murins peut être problématique car il est exprimé par une variété de cellules comme les cellules NK, les cellules T activées et les cellules B (Dembic, Schenck, et Bogen 2000; Solovjov, Pluskota, et Plow 2005; Sanchez-Madrid et al. 1983). Le marqueur de surface CD115 est le récepteur du M-CSF, ainsi un co-marquage Cd11b+ et CD115 permet une discrimination beaucoup plus précise des monocytes. Ainsi, les différences constatées entre les deux études dans les pourcentages de monocytes Ly6C^{high} 10 jours après irradiation sont très certainement liées à cette différence d'identification.

B. Traffic entre la moelle osseuse le sang et la rate

Il est intéressant de noter les différences de proportion de monocytes entre les différents organes.

Les populations monocytaires de la circulation sanguine Ly6C^{High} et Ly6C^{Low} étaient significativement augmentées 10 jours après irradiation, tandis que dans la rate, ce sont les monocytes Ly6C^{low} qui était significativement augmentés au bout d'une durée de 100 jours après irradiations.

Les monocytes sont produits dans la moelle osseuse et sont ensuite exportés vers la circulation sanguine afin de se diriger vers le site d'inflammation. L'étude de Swirski (Swirski et al. 2009) a montré que la rate pouvait tenir le rôle de réservoir de monocytes et déployer rapidement ces cellules en cas d'inflammation. Il a aussi été montré que la splénectomie dans des modèles de prédisposition à l'athérosclérose ApoE^(-/-) entraînait une diminution de l'accumulation de monocytes et de macrophages dans les plaques (Robbins et al. 2012). Nous pouvons faire l'hypothèse que la hausse de la proportion de monocytes Ly6C^{low} ainsi que la tendance à la hausse des monocytes Ly6C^{High} dans la rate est un indicateur d'une hausse au cours du temps et après irradiation du stockage splénique des monocytes. Ce stockage splénique pourrait débuter dès 10 jours après irradiation par un passage des monocytes sanguins dans la rate.

Nous avons également analysé les populations monocytaires présentes dans la moelle osseuse, il était cependant plus difficile, dans notre étude de distinguer les différents sous types monocytes CD115+ que dans le sang ou la rate comme représenté dans la figure ci-dessous (Figure 41).

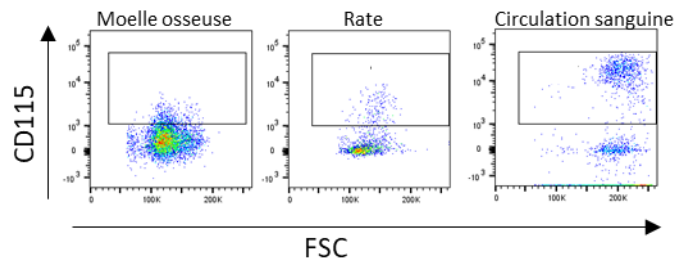


Figure 41 Nuage de points ou « Dot plot » représentant les cellules CD115 positives parmi les cellules CD11b+Gr- dans la moelle osseuse, la rate et dans la circulation sanguine.

Une fois ces hypothèses évoquées, il convient de souligner que le paradigme de l'origine monocytaires des macrophages proliférant dans la plaque a été remis en question, notamment par l'étude de Robbins, 2013 (Robbins et al. 2013) évoquant que la contribution de la prolifération locale dans l'accumulation des macrophages des plaques d'athérome serait plus forte que celle liée à l'influx de monocytes.

Un autre point concerne le rôle de ce sous-type monocyttaire dans la plaque d'athérome. En particulier parce que la différenciation des monocytes Ly6C^{High} en macrophages M1 proposée par Moore 2013, (K. J. Moore, Sheedy, et Fisher 2013) n'est pas certaine. En effet, les travaux de Rahman, 2017 (Rahman et al. 2017) suggèrent que le recrutement de monocytes Ly6C^{High} inflammatoire peut, dans certaines conditions, se polariser en macrophage M2 et ainsi participer à la régression de la plaque.

Enfin, la capacité des monocytes à être guidés par des chimiokines est très importante afin de permettre aux monocytes d'être dirigés vers leur site d'action. Nous avons essayé de comprendre si l'irradiation affectait la motilité et la transmigration des monocytes en utilisant un modèle de cellules humaines Thp-1 *in vitro*. Les résultats obtenus montrent une forte hausse de ces deux paramètres à 3 jours après irradiations à l'ensemble des doses. Cette motilité et transmigration accrue 3 jours après irradiations peuvent témoigner d'une stimulation de la mobilisation monocyttaire vers le site d'inflammation, qui dans le cadre de l'athérosclérose va dans le sens d'une aggravation de l'inflammation. Cet effet ne perdure cependant pas dans le temps et peut s'interpréter comme une réponse transitoire à relativement court terme post irradiation.

Cependant il convient de souligner les limites de ce modèle dans la comparaison avec les données obtenues sur les animaux. Le modèle Thp-1 présente un certain nombre de différences avec les cellules primaires humaines en matière de sécrétion de cytokines ou d'expression de gènes (Chanput, Mes, et Wichers 2014). Il est ainsi aisé d'imaginer les différences entre cellules primaires murines et cellules immortalisées humaines.

2. Macrophages

L'étude des effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur les populations de macrophages ont fait l'objet d'une étude à court terme sur la polarisation de cellules myéloïdes primaires de moelle osseuse, et d'une étude à long terme sur les effets des macrophages au sein des plaques d'athérome.

A. Effets sur la polarisation

Après avoir différencié des macrophages en culture provenant de la moelle osseuse de souris ApoE^(-/-) exposées à des doses faibles à modérées de rayonnements ionisants, nous avons observé, 24 heures après irradiation,

un profil anti inflammatoire accru chez les macrophages M2 et dans une moindre mesure les macrophages M0. Les macrophages alternativement activés M2 sécrétaient significativement plus d'IL-10 dans leur milieu de culture. De plus l'analyse en expression de gènes des cellules a montré une hausse de l'expression de gènes anti-inflammatoires, c'est-à-dire EGR2, Chil-3, Retn1a et Arginase-1 par rapport au groupe non exposé. Il convient de relever que ces augmentations ont été particulièrement significatives aux plus fortes doses d'exposition, à 0.5 et 1 Gy.

Pour comparaison, dans l'étude de Coates (Coates et al. 2008) les auteurs ont cultivé des macrophages provenant de moelle osseuse de souris C57/Bl6 et de souris CBA/ca et ont procédé à deux types d'irradiations ; une irradiation de l'animal corps entier avant culture des macrophages, et une irradiation directe des flasques de cellules, avec une dose plus élevée de 4 Gy. Ceux-ci observent que le profil génique des macrophages issus de souris C57/Bl6 favorise un profil de type M2, anti-inflammatoire confirmé par une hausse de l'expression d'arginase-1 par les cellules. Il est important de noter que cette différence a été observée chez les macrophages issus d'animaux irradiés, et non pour les cellules irradiées, ce qui souligne le fait que l'activation des macrophages n'est pas une réponse directe à l'irradiation mais une réponse tissulaire secondaire à l'exposition.

Nous avons ainsi obtenu des résultats relativement similaires avec une réponse des macrophages M0 de type M2 qui présente une expression accrue en gènes codant pour Arginase-1 et une hausse de la sécrétion en cytokine IL-10 mais à une dose significativement plus basse (1 Gy). De façon similaire à la précédente étude, l'environnement tissulaire de la moelle osseuse de souris prédisposées à l'athérosclérose doit avoir un rôle important dans l'activation macrophagique conduisant à cette réponse anti-inflammatoire.

Une autre étude plus récente de Wunderlich et son équipe (Wunderlich et al. 2015) a consisté en la mise en culture de macrophages péritonéaux de souris BALB/c et de l'irradiation à une gamme de doses allant de 0.01 Gy à 2 Gy de rayons X. Les auteurs observent qu'à la dose de 0.5 Gy, la cytokine pro inflammatoire IL-1 β est significativement diminuée tandis que TGF β est significativement augmenté chez les macrophages classiquement activés M1 traduisant une sécrétion anti-inflammatoire accrue des macrophages.

Nous n'avons pas observé de tels effets dans nos études, sur la sécrétion en cytokines des macrophages M1, cela peut être dû à la différence du protocole expérimental, notamment avec les espèces de souris qui peuvent avoir des différences d'activation macrophagique après exposition aux rayonnements ionisants, qui sont inhérentes à l'espèce, comme cela a été observé dans l'étude Coates (Coates et al. 2008) entre les souris C57/Bl6 et les souris CBA/ca.

Ces études, bien que présentant des différences, montrent un effet immunomodulateur des rayonnements ionisants dans la polarisation macrophagique, favorisant un profil de type alternativement activé ou M2. Ces effets qui étaient jusqu'ici observés dans des souris « wild type » sont confirmés également auprès de souris prédisposées à l'athérosclérose. Les macrophages de type M2 étant associés à une régression de l'athérosclérose, les effets athéro-protecteurs supposés dans les précédentes études (Mitchel et al. 2013; Le Gallic et al. 2015b; Mitchel et al. 2011; T. G. Ebrahimian et al. 2017) pourraient, en partie, être liés à cette polarisation des macrophages.

Evidemment, il convient d'être prudent concernant le paradigme dissociant les macrophages M1 et M2. Comme l'expliquent Martinez et Gordon, (Martinez et Gordon 2014), les macrophages ne forment pas de sous-ensemble stable, mais répondent à une combinaison de facteurs présents dans le micro-environnement

tissulaire. Les auteurs parlent non pas de sous-ensembles mais plutôt de voies qui interagissent pour former un phénotype complexe, voire mixte.

B. Effets sur les macrophages intra-plaques

L'exploration des macrophages logés au sein des plaques de souris ApoE^(-/-) par l'identification du marqueur CD68 a montré une réduction du taux de ces cellules à la dose de 1 Gy 100 jours après expositions. D'autre part, la quantification du taux de cellules musculaires lisses au sein des plaques n'a pas montré de différences significatives par rapport au contrôle non irradié. Nous pensons donc que cette réduction concerne majoritairement les cellules macrophagiques et non les CML. Cette diminution est un indicateur favorable pour l'évolution de la plaque d'athérome, une présence moindre de macrophages signifie une diminution du captage des LDL et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires amoindrie.

Cet effet intervient à la dose d'irradiation la plus élevée que nous ayons appliquée. C'est également à cette dose de 1 Gy que nous observons une activité anti-inflammatoire accrue des macrophages M0 et M2 à court terme après irradiation. Ainsi nous pouvons supposer que les effets observés peu de temps après irradiation sur les macrophages ont des conséquences sur la plaque à long terme après irradiation

3. Lymphocytes T

L'étude portant sur les populations lymphocytaires de souris ApoE^(-/-) exposées aux irradiations à faible doses a fait l'objet d'analyses par immunophénotypage dans la rate d'une part et d'immunohistochimie sur les plaques d'athérome à long terme après irradiation d'autre part.

Différentes études ont rapporté que l'exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants entraînait différents types d'effets sur les cellules T comme par exemple une hausse de la population de lymphocytes T CD4⁺ (S. Liu, Han, et Liu 1994; Pandey et al. 2005; Ishii et al. 1996; S. Liu et al. 1994; Song et al. 2015). Dans la 1^{ère} étude réalisée sur des souris ApoE^(-/-) irradiées à une gamme de doses faibles à modérées à débit de doses faibles et élevés, nous avons observé une diminution significative de la proportion de lymphocytes T_{CD4⁺CD69⁺} pro-inflammatoires à 100 mGy à débit de dose faible (1,4 mGy.h⁻¹). Par ailleurs la tendance montrait une diminution de la proportion de ces populations à 0,1 Gy et 0,2 Gy, puis une augmentation à 0,75 Gy, traduisant une relation effet-dose non linéaire. Il convient cependant d'être prudent car seule la diminution à 0,1 Gy était significative.

Concernant les lymphocytes T régulateurs ou Treg_{CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺} il a été rapporté que ces cellules étaient diminuées chez les rongeurs après exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants, favorisant plutôt une activité anti-tumorale et donc pro-inflammatoire (Wang et al. 2014a; R. Liu et al. 2010a). A l'opposé, Nakatsukaza, 2010 (Nakatsukasa et al. 2010) a observé que les cellules T reg étaient significativement augmentées chez des souris affectées par de l'arthrite, une maladie inflammatoire affectant les articulations. Nous n'avons pas observé de tels effets, dans un sens ou dans l'autre chez nos populations de cellules Treg.

Concernant l'étude sur l'impact à long terme des faibles doses de rayonnements ionisants, la quantification sur des lymphocytes CD3⁺ dans les plaques n'a pas démontré d'effets à long terme, par rapport au groupe contrôle non irradié. Ces catégories de lymphocytes incluent un large panel de sous-types lymphocytaires, il pourrait donc être intéressant d'étudier, dans des circonstances similaires, les effets sur les sous-populations

de lymphocytes T effecteurs ou T régulateurs au sein de la plaque d'athérome afin de voir si une de ces sous-populations n'est pas affectée.

II. Effets liés à la dose, au débit de dose et au temps

Effets liés au débit

De nombreuses études ont mis en évidence l'influence du débit de dose dans la réponse observée sur différents systèmes physiologiques. Concernant l'athérosclérose, les études ont montré que des débits de dose faibles entraînent un profil de plaque moins lésionnel qu'à fort débit de dose. (Mitchel et al, 2011, Mancusso et al, 2015).

Dans nos études sur le système immunitaire, nous avons utilisés 3 débits de doses différents ; $1,4 \text{ mGy.h}^{-1}$, 50 mGy.h^{-1} , et $10,35 \text{ mGy.min}^{-1}$ correspondant à 621 mGy.h^{-1} . Cela témoigne d'une variation significative dans la vitesse d'attribution de la dose parmi nos modèles animaux. Nous avons constaté avec les résultats d'immunophénotypage que la réponse des cellules monocytaires était impactée quel que soit le débit de dose d'exposition utilisé mais entraînait des réponses cellulaires différentes. Dans la circulation sanguine, la réponse était similaire pour les 2 débits de doses les plus faibles et caractérisée par un amoindrissement de la proportion de cellules monocytaires, tandis que les débits de doses les plus élevés ont entraîné une augmentation de cette proportion et ce pour des doses identiques. Bien évidemment il convient d'être prudent quant à la comparaison entre différentes catégories de sous-types monocytaires, ($\text{CD11b+LyG-Ly6C}^{\pm}$ vs $\text{CD11b+LyG-CD115+Ly6C}^{\pm}$). Néanmoins ces variations de réponses soulignent l'importance, de prendre en compte non seulement la dose mais le débit de dose dans la réponse immunitaire à doses faibles et modérées.

Par ailleurs, ces variations liées au débit de dose observées chez les monocytes ont été nettement moins sensibles chez les populations de cellules T étudiées. Nous n'avons observé aucune différence dans les populations de lymphocytes T CD3^+ logées dans les plaques d'athérome exposées au plus fort débit de dose. Ensuite, les seules modifications sensibles que nous ayons perçues dans les proportions de différents sous-type cellules T ont été observées au plus faible débit de dose de $1,4 \text{ mGy.h}^{-1}$ chez les lymphocytes T CD4+CD69^+ . Cela souligne que la réponse débit de dose-dépendant est différente entre les cellules T et les monocytes.

Effets liés au temps

L'effet du temps a une grande importance dans le contexte de notre étude. Des données additionnelles portant sur notre étude de la polarisation des macrophages, non publiées dans ce mémoire, ont montré que les mesures d'expression de gènes et de sécrétions de cytokines n'étaient pas modifiées chez l'ensemble des sous-types de macrophages par rapport au groupe témoin. Cela indique que la réponse anti-inflammatoire des macrophages M2 et M0 que nous avons détectée après 24 heures ne perdure pas dans le temps, l'irradiation entraîne donc une réponse immédiate qui est stabilisée après quelques jours post exposition. Nous observons cependant après 100 jours une modification de la teneur en macrophages des plaques d'athérome, témoignant de mécanismes précoces ayant des répercussions à long terme.

Effets liés à la dose

Lors de nos différentes études, nous avons fait le choix d'utiliser des gammes de doses relativement larges, nos protocoles d'exposition comprenaient des doses allant de la dose faible (0,05 Gy) à une dose considérée comme modérée et presque forte (1 Gy) dans le sens des recommandations émises par l'UNSCEAR. L'utilisation d'une gamme de dose nous a permis d'identifier les doses potentialisant le plus les effets. Nous avons pu remarquer que la dose de 1 Gy (associée à un débit de dose élevé) générait des réponses anti-inflammatoires très intéressante dans les populations de macrophages M0 et M2 mais aussi chez les populations monocytaires Ly6C^{High}. Les doses qui engendrent une réponse adaptative n'entrent donc pas nécessairement dans la catégorie des doses faibles. Hildebrandt et Dörthe ont montré des résultats similaires à des doses modérées, dans des expérimentations portant sur des modèles d'arthrites exposés à des doses atteignant 5 Gy, et qui stimulait des mécanismes biologiques anti-inflammatoires (Dörthe Schaeue et al. 2005a; G. Hildebrandt 2000; Liebmann et al. 2004).

Inversement, ce sont les plus faibles doses d'exposition (200 mGy) qui affectaient les populations lymphocytaires. Il est ainsi difficile de prédire avec exactitude quelle sera la réponse d'un système biologique à une irradiation en tenant uniquement en compte de la dose. L'environnement biologique détient aussi une très grande importance.

III. Impact du microenvironnement

La prise en compte du microenvironnement biologique est essentielle dans l'étude des effets des faibles doses de rayonnements ionisants sur le système immunitaire. Afin de mettre son importance en évidence, il peut être intéressant de comparer les effets des faibles doses dans la pathologie cancéreuse. En effet, des études expérimentales et épidémiologiques ont indiqués que les faibles doses de rayonnements ionisants pouvaient inhiber la croissance des tumeurs, des métastases ainsi que leur incidence par une stimulation de la réponse immunitaire (Feinendegen 2005).

Par exemple, dans un modèle de lymphome de thymus induit par une irradiation à forte dose, un traitement par des faibles doses d'irradiation (0,05 à 0,2 Gy) 6 à 24 h avant chaque application de fortes doses pouvait significativement réduire l'incidence du lymphome. Cet effet était accompagné d'une stimulation de l'immunité active contre les cellules cancéreuse (X. Li et al. 1999). Il a aussi été observé que le nombre et la fonction des lymphocytes T régulateurs étaient significativement diminués dans des modèles de rats et de souris affectés

par des tumeurs après traitement avec des faibles doses de rayonnements ionisants (R. Liu et al. 2010b; Wang et al. 2014b) ce qui favorisait une activité anti-tumorale du système immunitaire.

Dans notre cas, avec un modèle murin prédisposé à l'athérosclérose, nous avons un microenvironnement qui est caractérisé par une inflammation de l'artère trop importante, qui à certains égards peut être comparé à une maladie auto-immune. Mais contrairement aux études sur le cancer, les effets observés dans notre étude vont dans le sens d'une modulation du système immunitaire. Cela signifie que le microenvironnement immunitaire et pathologique est déterminant pour l'orientation des effets qui surviennent à faibles doses.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

L'objet de cette thèse était de comprendre dans quelle mesure les mécanismes adaptatifs immunomodulateurs après exposition aux faibles doses de rayonnements ionisants interviennent dans le contexte de la pathologie athéromateuse.

Ainsi, nous avons pu montrer que l'exposition à faible dose par irradiation externe affectait de façon différente les cellules immunitaires ; les cellules T suivent une réponse non linéaire et sont affectées aux plus faibles doses d'irradiation, tandis que les monocytes sont affectés à l'ensemble des doses et en particulier aux doses modérées autour de 1 Gy. Par ailleurs cette réponse chez les monocytes était caractérisée par une diminution des populations sanguines pro-inflammatoires.

Par ailleurs nous avons mis en évidence que les doses modérées de rayonnements ionisants influencent la polarisation des macrophages à court terme après irradiation et stimulent les propriétés anti-inflammatoires des macrophages de type M2 par une augmentation de l'expression de gènes et une hausse de sécrétions en cytokines anti-inflammatoires. De plus, cette réponse à court terme induit des conséquences à long terme dans la plaque d'athérome par une réduction significative du contenu en macrophages à la dose de 1 Gy.

La comparaison entre les différents débits de dose a également montré que des mécanismes adaptatifs pouvaient être impliqués à des débits de dose plus élevés et avoir des effets similaires aux expositions réalisées de manière chronique, cependant un débit de dose faible et une dose faible induit en plus une baisse des lymphocyte T pro-inflammatoires. Par ailleurs les doses modérées, entre 0,5 et 1 Gy ont également entraîné des réponses anti-inflammatoires en association principalement avec une polarisation macrophagique de type M2.

L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un effet modulateur de la réponse immunitaire après exposition à des doses faibles et modérées d'irradiation dans le contexte de l'athérosclérose. Ces résultats attestent également que ces mécanismes peuvent survenir dans des conditions variées de doses, de débit de dose et de délai de latence post-irradiation.

Ces résultats ouvrent ainsi de nombreuses perspectives, notamment la question des mécanismes intracellulaires et moléculaires gouvernant ces effets et qui reste encore à être explorée. Par exemple, le « trafficking » des cellules immunitaires au cours du temps et au niveau des différents organes lymphoïdes primaires et secondaires. De plus la question du microenvironnement mérite tout particulièrement d'être étudiée dans le contexte de la radiobiologie. Des variations de l'environnement pathologique général ou du microenvironnement local peuvent orienter la réponse radio-induite.

De ce fait, les études futures permettront ainsi d'étendre nos champs de compréhension des effets à faibles doses sur les pathologies cardiovasculaires en incluant des facteurs de risques tels que l'hypertension ou le stress qui vont ainsi modifier le microenvironnement local et peut-être potentialiser la réponse aux faibles doses sur la pathologie athéromateuse.

Valorisations

VALORISATIONS

I. Publications

Exposure to low to moderate doses of ionizing radiation induces a reduction of pro-inflammatory Ly6Chigh monocytes and a U-curved response of T cells in ApoE^(-/-) mice.

¹N. Rey, ²T. Ebrahimian, ¹C. Gloaguen, ¹D. Kereselidze, ¹V. Magneron, ¹A. Bontemps, ¹C. Demarquay, ³G. Olsson
³S. Haghdoost, ²S. Lehoux, ¹T.G. Ebrahimian.

1. Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, laboratoire de radiotoxicologie et de radiobiologie expérimentale, 92260, Fontenay-aux Roses-France.
2. McGill University, Division of Experimental Medicine, Montreal, Canada
3. Centre for Radiation Protection Research, Department Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, 106 91 Stockholm, Sweden.

(Soumis dans Dose-Response)

Low to moderate dose 137Cs (γ) radiation enhances M2 type macrophages function at short term associated with reduced plaque inflammation at long term exposure in ApoE^(-/-) mice.

¹N. Rey, ²T. Ebrahimian, ¹C. Gloaguen, ¹D. Kereselidze, ¹C. Brizais, ¹F. Bachelot, ¹G. Riazi, ¹V. Monceau
¹Demarquay, ¹I. Garali Zineddine, ¹D. Klokov, ³K. Balabanian, ²S. Lehoux, ¹T.G. Ebrahimian.

1. Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, laboratoire de radiotoxicologie et de radiobiologie expérimentale, 92260, Fontenay-aux Roses-France.
2. McGill University, Division of Experimental Medicine, Montreal, Canada
3. Institut de Recherche Saint-Louis, Inserm U1160, 75010 Paris.

(En cours de rédaction)

II. Communications

Communications affichées

- « Immunomodulation in atherosclerosis after exposure to low and moderate dose of ionising radiation: Monocyte response »

Congrès "International symposium on Atherosclerosis" Juin 2018, Toronto, Canada.

- "Effet d'une exposition à faibles doses sur les maladies de l'appareil circulatoire : Données expérimentales"

Présentation des activités de PSE-Santé au Conseil scientifique de l'IRSN, Juillet 2019, Fontenay Aux roses, France.

- « Effets des faibles doses de rayonnements γ dans la pathologie athéromateuse : Etude des mécanismes immunomodulateurs »

Journée des thèses de l'école de doctorale, Juin 2019, Chatenay-Malabry, France.

Communications orales

- « Etude des mécanismes immunomodulateurs après exposition à des doses faibles à modérées de rayonnements ionisants dans la pathologie athéromateuse »

Journée de thèse de l'IRSN, Avril 2019, La Grande Motte, France.

- « Low to moderate doses of external γ ionizing radiation regulates monocyte response in the context of atherosclerosis ».

Congrès "International Conference for Radiation Research", Septembre 2019, Manchester, Royaume-Uni.

III. Autre

- Obtention du diplôme d'expérimentation animale de niveau 1 - Ecole nationale Vétérinaire d'Alfort. (Mars 2018)
- Obtention du diplôme de formation réglementaire de base en chirurgie chez le rongeur de laboratoire. (Octobre 2019)
- Encadrement d'une stagiaire de master II en toxicologie.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Abram, Clare L, et Clifford A Lowell. 2009. « The ins and outs of leukocyte integrin signaling ». *Annual review of immunology* 27: 339–362.
- Adams, M. Jacob, Stuart R. Lipsitz, Steven D. Colan, Nancy J. Tarbell, S. Ted Treves, Lisa Diller, Nina Greenbaum, Peter Mauch, et Steven E. Lipshultz. 2004. « Cardiovascular status in long-term survivors of Hodgkin's disease treated with chest radiotherapy ». *Journal of Clinical Oncology* 22 (15): 3139-48.
- Aiello, Robert J, Patricia-Ann K Bourassa, Saralyn Lindsey, Weifan Weng, Edward Natoli, Barrett J Rollins, et Patrice M Milos. 1999. « Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19 (6): 1518–1525.
- Ait-Oufella, Hafid, Benoît L Salomon, Stéphane Potteaux, Anna-Karin L Robertson, Pierre Gourdy, Joffrey Zoll, Régine Merval, et al. 2006. « Natural Regulatory T Cells Control the Development of Atherosclerosis in Mice ». *Nature Medicine* 12 (2): 178-80. <https://doi.org/10.1038/nm1343>.
- Ait-Oufella, Hafid, Soraya Taleb, Ziad Mallat, et Alain Tedgui. 2011. « Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (5): 969-79. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207415>.
- Anderson, Robert E, et Ivan Lefkovits. 1979. « In vitro evaluation of radiation-induced augmentation of the immune response. » *The American Journal of Pathology* 97 (3): 456.
- Arenas, Meritxell, Fèlix Gil, Meritxell Gironella, Víctor Hernández, Sandra Jorcano, Albert Biete, Josep M. Piqué, et Julián Panés. 2006. « Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice ». *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 66 (2): 560-67.
- Armstrong, Allison J, Abraham K Gebre, John S Parks, et Catherine C Hedrick. 2010. « ATP-binding cassette transporter G1 negatively regulates thymocyte and peripheral lymphocyte proliferation ». *The journal of immunology* 184 (1): 173–183.
- Auffray, Cedric, Darin Fogg, Meriem Garfa, Gaelle Elain, Olivier Join-Lambert, Samer Kayal, Sabine Sarnacki, Ana Cumano, Gregoire Lauvau, et Frederic Geissmann. 2007. « Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior ». *Science* 317 (5838): 666–670.
- Auffray, Cedric, Darin K Fogg, Emilie Narni-Mancinelli, Brigitte Senechal, Celine Trouillet, Noah Saederup, Julia Leemput, et al. 2009. « CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation ». *Journal of Experimental Medicine* 206 (3): 595–606.
- Auffray, Cedric, Michael H Sieweke, et Frederic Geissmann. 2009. « Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells ». *Annual review of immunology* 27.
- Azizova, T. V., E. S. Grigorieva, N. Hunter, M. V. Pikulina, et M. B. Moseeva. 2015. « Risk of Mortality from Circulatory Diseases in Mayak Workers Cohort Following Occupational Radiation Exposure ». *Journal of Radiological Protection: Official Journal of the Society for Radiological Protection* 35 (3): 517-38. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/35/3/517>.
- Azizova, T. V., R. G. E. Haylock, M. B. Moseeva, M. V. Bannikova, et E. S. Grigoryeva. 2014. « Cerebrovascular Diseases Incidence and Mortality in an Extended Mayak Worker Cohort 1948–1982 ». *Radiation Research* 182 (5): 529-44. <https://www.jstor.org/stable/24545422>.
- Azizova, T. V., C. R. Muirhead, M. B. Druzhinina, E. S. Grigoryeva, E. V. Vlasenko, M. V. Sumina, J. A. O'Hagan, W. Zhang, R. G. E. Haylock, et N. Hunter. 2010. « Cardiovascular Diseases in the Cohort of Workers First Employed at Mayak PA in 1948–1958 ». *Radiation Research* 174 (2): 155-68. <https://doi.org/10.1667/RR1789.1>.

- Azizova, Tamara, Evgeniya Grigoryeva, Richard Haylock, Maria Pikulina, et Maria Moseeva. 2015. « Ischemic heart disease incidence and mortality in an extended cohort of Mayak workers first employed in 1948 – 1982 ». *The British journal of radiology* 88 (juillet): 20150169. <https://doi.org/10.1259/bjr.20150169>.
- Azizova, Tamara V., Colin R. Muirhead, Maria B. Moseeva, Evgenia S. Grigoryeva, Elena V. Vlasenko, Nezahat Hunter, Richard G.E. Haylock, et Jacqueline A. O'Hagan. 2012. « Ischemic Heart Disease in Nuclear Workers First Employed at the Mayak PA in 1948–1972 »: *Health Physics* 103 (1): 3-14. <https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3182243a62>.
- Balashov, Konstantin E, James B Rottman, Howard L Weiner, et Wayne W Hancock. 1999. « CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (12): 6873–6878.
- Baselet, Bjorn, Charlotte Rombouts, Abderrafi Mohammed Benotmane, Sarah Baatout, et An Aerts. 2016. « Cardiovascular Diseases Related to Ionizing Radiation: The Risk of Low-Dose Exposure (Review) ». *International Journal of Molecular Medicine* 38 (6): 1623-41. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2777>.
- Behradmanesh, Saeed, et Parto Nasri. 2012. « Serum cholesterol and LDL-C in association with level of diastolic blood pressure in type 2 diabetic patients ». *Journal of renal injury prevention* 1 (1): 23.
- Belge, Kai-Uwe, Farshid Dayyani, Alexia Horelt, Maciej Siedlar, Marion Frankenberger, Bernhard Frankenberger, Terje Espevik, et Löms Ziegler-Heitbrock. 2002. « The proinflammatory CD14+ CD16+ DR++ monocytes are a major source of TNF ». *The Journal of Immunology* 168 (7): 3536–3542.
- Bertho, Jean-Marc, Marie-Cécile Faure, Sonia Louiba, Elie Tournalias, Johanna Stefani, Baptiste Siffert, François Paquet, et Isabelle Dublineau. 2011. « Influence on the mouse immune system of chronic ingestion of ¹³⁷Cs ». *Journal of radiological protection* 31 (1): 25.
- Binder, Christoph J, Karsten Hartvigsen, Mi-Kyung Chang, Marina Miller, David Broide, Wulf Palinski, Linda K Curtiss, Maripat Corr, et Joseph L Witztum. 2004a. « IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis ». *The Journal of clinical investigation* 114 (3): 427–437.
- . 2004b. « IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis ». *The Journal of clinical investigation* 114 (3): 427–437.
- Boehmer, Harald von, Pawel Kisielow, Hiroyuki Kishi, Bernadette Scott, Peter Borgulya, et Hung Sia Teh. 1989. « The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the $\alpha\beta$ receptor for antigen ». *Immunological reviews* 109 (1): 143–152.
- Boice Jr, John D. 2017. « The linear nonthreshold (LNT) model as used in radiation protection: an NCRP update ». *International journal of radiation biology* 93 (10): 1079–1092.
- Boivin, Jean-François, George B. Hutchison, Jay H. Lubin, et Peter Mauch. 1992. « Coronary artery disease mortality in patients treated for Hodgkin's disease ». *Cancer* 69: 1241-47.
- Bonizzi, Giuseppina, et Michael Karin. 2004. « The Two NF-KB Activation Pathways and Their Role in Innate and Adaptive Immunity ». *Trends in Immunology* 25 (6): 280-88. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.008>.
- Bonnet, J. 2005. « Athérosclérose ». *EMC - Cardiologie-Angéiologie* 2 (4): 436-58. <https://doi.org/10.1016/j.emcaa.2005.09.011>.
- Bouhrel, M Amine, Bruno Derudas, et Elena Rigamonti. s. d. « PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-Inflammatory Properties ». *Cell Metabolism*, 7.
- Boyanovsky, Boris B, Deneys R van der Westhuyzen, et Nancy R Webb. 2005. « Group V secretory phospholipase A2-modified low density lipoprotein promotes foam cell formation by a SR-A-and CD36-independent process that involves cellular proteoglycans ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (38): 32746–32752.

- Brand, K, S Page, G Rogler, A Bartsch, R Brandl, R Knuechel, M Page, C Kaltschmidt, P A Baeuerle, et D Neumeier. 1996. « Activated Transcription Factor Nuclear Factor-Kappa B Is Present in the Atherosclerotic Lesion. » *Journal of Clinical Investigation* 97 (7): 1715-22. <https://doi.org/10.1172/JCI118598>.
- Budras, K. D., K. Hartung, et B. M. Münzer. 1986. « [Light and electron microscopy studies of the effect of roentgen irradiation on the synovial membrane of the inflamed knee joint] ». *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 99 (5): 148-52.
- Burkett, Patrick R, Gerd Meyer zu Horste, et Vijay K Kuchroo. 2015. « Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity ». *The Journal of clinical investigation* 125 (6): 2211–2219.
- Butcher, Matthew J, Adam R Filipowicz, Tayab C Waseem, Christopher M McGary, Kevin J Crow, Nathaniel Magilnick, Mark Boldin, Patric S Lundberg, et Elena V Galkina. 2016. « Atherosclerosis-driven Treg plasticity results in formation of a dysfunctional subset of plastic IFN γ + Th1/Tregs ». *Circulation research* 119 (11): 1190–1203.
- Caligiuri, Giuseppina, Antonino Nicoletti, Bruno Poirier, Göran K Hansson, et others. 2002. « Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice ». *The Journal of clinical investigation* 109 (6): 745–753.
- Caligiuri, Giuseppina, Mats Rudling, Véronique Ollivier, Marie-Paule Jacob, Jean-Baptiste Michel, Göran K Hansson, et Antonino Nicoletti. 2003. « Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice ». *Molecular medicine* 9 (1-2): 10–17.
- Canault, M, F Peiretti, M Poggi, Christoph Müller, F Kopp, B Bonardo, D Bastelica, A Nicolay, M-C Alessi, et G Nalbone. 2008. « Progression of atherosclerosis in ApoE-deficient mice that express distinct molecular forms of TNF-alpha ». *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 214 (5): 574–583.
- Candéias, Serge M, Justyna Mika, Paul Finnon, Tom Verbiest, Rosemary Finnon, Natalie Brown, Simon Bouffler, Joanna Polanska, et Christophe Badie. 2017. « Low-dose radiation accelerates aging of the T-cell receptor repertoire in CBA/Ca mice ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (23): 4339–4351.
- Cardilo-Reis, Larissa, Sabrina Gruber, Sabine M Schreier, Maik Drechsler, Nikolina Papac-Milicevic, Christian Weber, Oswald Wagner, Herbert Stangl, Oliver Soehnlein, et Christoph J Binder. 2012. « Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype ». *EMBO molecular medicine* 4 (10): 1072–1086.
- Chanput, Wasaporn, Jurriaan J Mes, et Harry J Wichers. 2014. « THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach ». *International immunopharmacology* 23 (1): 37–45.
- Chaplin, David D. 2010. « Overview of the immune response ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2): S3–S23.
- Cheda, Aneta, Ewa M Nowosielska, Jolanta Wrembel-Wargocka, et Marek K Janiak. 2008. « Production of cytokines by peritoneal macrophages and splenocytes after exposures of mice to low doses of X-rays ». *Radiation and environmental biophysics* 47 (2): 275–283.
- Cheda, Aneta, Jolanta Wrembel-Wargocka, Emil Lisiak, Ewa M Nowosielska, Maria Marciniak, et Marek K Janiak. 2004. « Single low doses of X rays inhibit the development of experimental tumor metastases and trigger the activities of NK cells in mice ». *Radiation research* 161 (3): 335–340.
- Cho, Kyu Yong, Hideaki Miyoshi, Satoshi Kuroda, Hiroshi Yasuda, Kenji Kamiyama, Joji Nakagawara, Masayoshi Takigami, Takuma Kondo, et Tatsuya Atsumi. 2013. « The Phenotype of Infiltrating Macrophages Influences Arteriosclerotic Plaque Vulnerability in the Carotid Artery ». *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 22 (7): 910-18. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.11.020>.
- CNRS. s. d. « Modes d'expositions Exposition interne, par contact et externe ». https://www.laradioactive.com/site/pages/Modes_expositions_rayonnements_ionisants.htm.

- Coates, Philip J, Jana K Rundle, Sally A Lorimore, et Eric G Wright. 2008. « Indirect macrophage responses to ionizing radiation: implications for genotype-dependent bystander signaling ». *Cancer research* 68 (2): 450–456.
- Colin, Sophie, Giulia Chinetti-Gbaguidi, et Bart Staels. 2014. « Macrophage Phenotypes in Atherosclerosis ». *Immunological Reviews* 262 (1): 153-66. <https://doi.org/10.1111/imr.12218>.
- Collins, Robert G, Rizwan Velji, Natalia V Guevara, M John Hicks, Lawrence Chan, et Arthur L Beaudet. 2000. « P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice ». *The Journal of experimental medicine* 191 (1): 189–194.
- Corsini, Alberto, Franco Bernini, Pierangelo Quarato, Elena Donetti, Stefano Bellosta, Remo Fumagalli, Rodolfo Paoletti, et Maurizio R Soma. 1996. « Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors ». *Cardiology* 87 (6): 458–468.
- Council, National Research, et others. 2006. *Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation: BEIR VII phase 2*. Vol. 7. National Academies Press.
- Cros, Jérôme, Nicolas Cagnard, Kevin Woollard, Natacha Patey, Shen-Ying Zhang, Brigitte Senechal, Anne Puel, et al. 2010. « Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors ». *Immunity* 33 (3): 375–386.
- Darby, Sarah, Paul McGale, Richard Peto, Fredrik Granath, Per Hall, et Anders Ekblom. 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): 256-57.
- Das, Hiranmoy, Ajay Kumar, Zhiyong Lin, Willmar D. Patino, Paul M. Hwang, Mark W. Feinberg, Pradip K. Majumder, et Mukesh K. Jain. 2006. « Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (17): 6653-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508235103>.
- Davenport, Piers, et Peter G Tipping. 2003. « The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice ». *The American journal of pathology* 163 (3): 1117–1125.
- Day, Tanya K, Antony M Hooker, Guoxin Zeng, et Pamela J Sykes. 2007. « Low dose X-radiation adaptive response in spleen and prostate of Atm knockout heterozygous mice ». *International Journal of Radiation Biology* 83 (8): 523–534.
- Delavary, Babak Mahdavian, Willem M. van der Veer, Marjolein van Egmond, Frank B. Niessen, et Robert H.J. Beelen. 2011. « Macrophages in Skin Injury and Repair ». *Immunobiology* 216 (7): 753-62. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.01.001>.
- Dembic, Zlatko, Karl Schenck, et Bjarne Bogen. 2000. « Dendritic cells purified from myeloma are primed with tumor-specific antigen (idiotype) and activate CD4+ T cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (6): 2697–2702.
- Dimova, Evgeniya G, Peter E Bryant, et Stephka G Chankova. 2008. « Adaptive response: some underlying mechanisms and open questions ». *Genetics and Molecular Biology* 31 (2): 396–408.
- Duewell, Peter, Hajime Kono, Katey J Rayner, Cheryl M Sirois, Gregory Vladimer, Franz G Bauernfeind, George S Abela, et al. 2010. « NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals ». *Nature* 464 (7293): 1357–1361.
- Ebrahimian, T. G., L. Beugnies, J. Surette, N. Priest, Y. Gueguen, C. Gloaguen, M. Benderitter, J. R. Jourdain, et K. Tack. 2017. « Chronic Exposure to External Low-Dose Gamma Radiation Induces an Increase in Anti-inflammatory and Anti-oxidative Parameters Resulting in Atherosclerotic Plaque Size Reduction in ApoE–/–Mice ». *Radiation research* 189 (2): 187-96.

- . 2018. « Chronic Exposure to External Low-Dose Gamma Radiation Induces an Increase in Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Parameters Resulting in Atherosclerotic Plaque Size Reduction in ApoE^{-/-} Mice ». *Radiation Research* 189 (2): 187-96. <https://doi.org/10.1667/RR14823.1>.
- Ebrahimian, T., C. Le Gallic, J. Stefani, I. Dublineau, R. Yentrapalli, M. Harms-Ringdahl, et S. Haghdooost. 2015. « Chronic Gamma-Irradiation Induces a Dose-Rate-Dependent Pro-Inflammatory Response and Associated Loss of Function in Human Umbilical Vein Endothelial Cells ». *Radiation Research* 183 (4): 447-54. <https://doi.org/10.1667/RR13732.1>.
- Entin-Meer, Michal, Arnon Afek, et Jacob George. 2009. « Regulatory T-Cells, FoxP3 and Atherosclerosis ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 665: 106-14. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1599-3_8.
- Erbel, Christian, Lili Chen, Florian Bea, Susanne Wangler, Sultan Celik, Felix Lasitschka, Ying Wang, Dittmar Böckler, Hugo A Katus, et Thomas J Dengler. 2009. « Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice ». *The Journal of Immunology* 183 (12): 8167–8175.
- Erl, Wolfgang, Peter C Weber, et Christian Weber. 1998. « Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands ». *Atherosclerosis* 136 (2): 297–303.
- Fatkhullina, A. R., I. O. Peshkova, et E. K. Koltsova. 2016. « The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis ». *Biochemistry. Biokhimiia* 81 (11): 1358-70. <https://doi.org/10.1134/S0006297916110134>.
- Feig, Jonathan E, John S Quick, et Edward A Fisher. 2009. « The role of a murine transplantation model of atherosclerosis regression in drug discovery ». *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)* 10 (3): 232.
- Feil, Susanne, Birgit Fehrenbacher, Robert Lukowski, Frank Essmann, Klaus Schulze-Osthoff, Martin Schaller, et Robert Feil. 2014. « Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis ». *Circulation research* 115 (7): 662–667.
- Feinendegen, LE. 2005. « Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis ». *The British journal of radiology* 78 (925): 3–7.
- Fischer, Carrie D., Jennifer K. Beatty, Stephanie C. Duquette, Douglas W. Morck, Merlyn J. Lucas, et André G. Buret. 2013. « Direct and Indirect Anti-Inflammatory Effects of Tulathromycin in Bovine Macrophages: Inhibition of CXCL-8 Secretion, Induction of Apoptosis, and Promotion of Efferocytosis ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (3): 1385-93. <https://doi.org/10.1128/AAC.01598-12>.
- Fontes, Jillian A, Noel R Rose, et Daniela Čiháková. 2015. « The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure ». *Cytokine* 74 (1): 62–68.
- Fredrikson, Gunilla Nordin, Linda Andersson, Ingrid Söderberg, Paul Dimayuga, Kuang-Yuh Chyu, Prediman K Shah, et Jan Nilsson. 2005. « Atheroprotective immunization with MDA-modified apo B-100 peptide sequences is associated with activation of Th2 specific antibody expression ». *Autoimmunity* 38 (2): 171–179.
- Freigang, Stefan, Franziska Ampenberger, Gunther Spohn, Sebastian Heer, Abdijapar T Shamshiev, Jan Kisielow, Martin Hersberger, Masayuki Yamamoto, Martin F Bachmann, et Manfred Kopf. 2011. « Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammasome activation and exacerbation of atherosclerosis ». *European journal of immunology* 41 (7): 2040–2051.
- Friedman, A D. 2007. « Transcriptional Control of Granulocyte and Monocyte Development ». *Oncogene* 26 (47): 6816-28. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210764>.

- G. Hildebrandt, F. Kamprad, J. Jahns, M. Hindemith, S. Spranger, U. Sack, R. W. Kinne, P. Madaj-Sterba, U. Wolf. 2000. « Effects of low dose radiation therapy on adjuvant induced arthritis in rats ». *International Journal of Radiation Biology* 76 (8): 1143-53. <https://doi.org/10.1080/09553000050111613>.
- Gage, Jessica, Mirela Hasu, Mohamed Thabet, et Stewart C Whitman. 2012. « Caspase-1 deficiency decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice ». *Canadian Journal of Cardiology* 28 (2): 222–229.
- Galkina, Elena, et Klaus Ley. 2007a. « Leukocyte influx in atherosclerosis ». *Current drug targets* 8 (12): 1239–1248.
- . 2007b. « Vascular adhesion molecules in atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27 (11): 2292–2301.
- Gautier, Emmanuel L, Claudia Jakubzick, et Gwendalyn J Randolph. 2009. « Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29 (10): 1412–1418.
- Geissmann, Frederic, Steffen Jung, et Dan R Littman. 2003. « Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties ». *Immunity* 19 (1): 71–82.
- Gils, Janine M van, Merran C Derby, Luciana R Fernandes, Bhama Ramkhelawon, Tathagat D Ray, Katey J Rayner, Sajesh Parathath, et al. 2012. « The Neuroimmune Guidance Cue Netrin-1 Promotes Atherosclerosis by Inhibiting the Emigration of Macrophages from Plaques ». *Nature Immunology* 13 (2): 136-43. <https://doi.org/10.1038/ni.2205>.
- Girard, Jean-Philippe, et Timothy A Springer. 1995. « High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration ». *Immunology today* 16 (9): 449–457.
- Goossens, Pieter, Marion JJ Gijbels, Alma Zerneck, Wouter Eijgelaar, Monique N Vergouwe, Ingeborg van der Made, Joris Vanderlocht, et al. 2010. « Myeloid type I interferon signaling promotes atherosclerosis by stimulating macrophage recruitment to lesions ». *Cell metabolism* 12 (2): 142–153.
- Gotsman Israel, Gracie Nir, Gupta Rajat, Dacosta Rosa, MacConmara Malcolm, Lederer James, Sukhova Galina, Witztum Joseph L., Sharpe Arlene H., et Lichtman Andrew H. 2006. « Impaired Regulatory T-Cell Response and Enhanced Atherosclerosis in the Absence of Inducible Costimulatory Molecule ». *Circulation* 114 (19): 2047-55. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.633263>.
- Gotsman Israel, Gupta Rajat, et Lichtman Andrew H. 2007. « The Influence of the Regulatory T Lymphocytes on Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (12): 2493-95. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.153064>.
- Grage-Griebenow, E, H-D Flad, et M Ernst. 2001. « Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets ». *Journal of leukocyte biology* 69 (1): 11–20.
- Guo, Jian, Vivian de Waard, Miranda Van Eck, Reeni B Hildebrand, Eva JA van Wanrooij, Johan Kuiper, Nobuyo Maeda, G Martin Benson, Pieter HE Groot, et Theo JC Van Berkel. 2005. « Repopulation of apolipoprotein E knockout mice with CCR2-deficient bone marrow progenitor cells does not inhibit ongoing atherosclerotic lesion development ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25 (5): 1014–1019.
- Hamers, Anouk AJ, Mariska Vos, Fadi Rassam, Goran Marinković, Kondababu Kurakula, Patrick J van Gorp, Menno PJ de Winther, Marion JJ Gijbels, Vivian de Waard, et Carlie JM de Vries. 2012. « Bone marrow-specific deficiency of nuclear receptor Nur77 enhances atherosclerosis ». *Circulation research* 110 (3): 428–438.
- Hanna, Richard N, Iftach Shaked, Harper G Hubbeling, Jennifer A Punt, Runpei Wu, Erica Herrley, Claudia Zaugg, et al. 2012. « NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis ». *Circulation research* 110 (3): 416–427.

- Hansson, G. K., P. Libby, et I. Tabas. 2015. « Inflammation and Plaque Vulnerability ». *Journal of Internal Medicine* 278 (5): 483-93. <https://doi.org/10.1111/joim.12406>.
- Hansson, Göran K., et Andreas Hermansson. 2011. « The immune system in atherosclerosis ». *Nature immunology* 12 (3): 204-12.
- Hansson, Goran K, Jan Holm, et L Jonasson. 1989. « Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. » *The American journal of pathology* 135 (1): 169.
- Harvey, Elizabeth J, et Dipak P Ramji. 2005. « Interferon- γ and atherosclerosis: pro-or anti-atherogenic? » *Cardiovascular research* 67 (1): 11–20.
- Hashimoto, Seiko, Hiroki Shirato, Masuo Hosokawa, Takeshi Nishioka, Yasuhiro Kuramitsu, Kazuhiro Matushita, Masanobu Kobayashi, et Kazuo Miyasaka. 1999. « The suppression of metastases and the change in host immune response after low-dose total-body irradiation in tumor-bearing rats ». *Radiation research* 151 (6): 717–724.
- Herrington William, Lacey Ben, Sherliker Paul, Armitage Jane, et Lewington Sarah. 2016. « Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease ». *Circulation Research* 118 (4): 535-46. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307611>.
- Hildebrandt, G, L Maggiorella, F Rödel, V Rödel, D Willis, et K-R Trott. 2002a. « Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro ». *International journal of radiation biology* 78 (4): 315–325.
- Hildebrandt, G., L. Maggiorella, F. Rödel, V. Rödel, D. Willis, et K.-R. Trott. 2002b. « Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro ». *International Journal of Radiation Biology* 78 (4): 315-25. <https://doi.org/10.1080/09553000110106027>.
- Hilgendorf, Ingo, Louisa MS Gerhardt, Timothy C Tan, Carla Winter, Tobias AW Holderried, Benjamin G Chousterman, Yoshiko Iwamoto, et al. 2014. « Ly-6High monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium ». *Circulation research* 114 (10): 1611–1622.
- Hilgendorf, Ingo, Filip K Swirski, et Clinton S Robbins. 2015. « Monocyte fate in atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35 (2): 272–279.
- Hillova, J, et V Drážil. 1967. « The inhibitory effect of iodoacetamide on recovery from sub-lethal damage in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 12 (3): 201–208.
- Hirose, Kuniaki, Kazuhisa Iwabuchi, Kazunori Shimada, Takashi Kiyonagi, Chihiro Iwahara, Hitoshi Nakayama, et Hiroyuki Daida. 2011. « Different Responses to Oxidized Low-Density Lipoproteins in Human Polarized Macrophages ». *Lipids in Health and Disease* 10 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-1>.
- Hornung, Veit, Franz Bauernfeind, Annett Halle, Eivind O Samstad, Hajime Kono, Kenneth L Rock, Katherine A Fitzgerald, et Eicke Latz. 2008. « Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization ». *Nature immunology* 9 (8): 847.
- Hosoi, Yoshio, et K Sakamoto. 1993. « Suppressive effect of low dose total body irradiation on lung metastasis: dose dependency and effective period ». *Radiotherapy and Oncology* 26 (2): 177–179.
- Houston, Mark C. 2013. « New concepts in cardiovascular disease ». *Journal of Restorative Medicine* 2 (1): 30–44.
- Hoving, Saske, Sylvia Heeneman, Marion JJ Gijbels, Johannes AM te Poele, Nicola S. Russell, Mat JAP Daemen, et Fiona A. Stewart. 2008. « 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* 71 (3): 848-57.

- Huber, Sally Ann, P Sakkinen, C David, MK Newell, et RP Tracy. 2001. « T helper–cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia ». *Circulation* 103 (21): 2610–2616.
- Ikushima, T. 1999. « Radioadaptive response: responses to the five questions ». *Human & experimental toxicology* 18 (7): 433–435.
- Ingersoll, Molly A, Rainer Spanbroek, Claudio Lottaz, Emmanuel L Gautier, Marion Frankenberger, Reinhard Hoffmann, Roland Lang, et al. 2010. « Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets ». *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 115 (3): e10–e19.
- Institut de radioprotection et sûreté nucléaire (IRSN). s. d. « Les conséquences des rayonnements ionisants au niveau de l'organisme ». La radioactivité et ses effets Les conséquences des rayonnements ionisants. <https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/rayonnements-ionisants-effets-radioprotection-sante/effets-rayonnements-ionisants/Pages/4-consequences-niveau-cellule.aspx#.X8EOlohKg2w>.
- Ionita, Mihaela G, Pleunie van den Borne, Louise M Catanzariti, Frans L Moll, Jean-Paul PM de Vries, Gerard Pasterkamp, Aryan Vink, et Dominique PV de Kleijn. 2010. « High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (9): 1842–1848.
- IRSN. 2019. « Les différents rayonnements ionisants : alpha, beta, gamma... » 2019.
- Ishii, Keiichiro, Yoshio Hosoi, Shougo Yamada, Tetsuya Ono, et Kiyohiko Sakamoto. 1996. « Decreased incidence of thymic lymphoma in AKR mice as a result of chronic, fractionated low-dose total-body X irradiation ». *Radiation research* 146 (5): 582–585.
- Jahns, Jutta, Ulf Anderegg, Anja Saalbach, Britt Rosin, Ina Patties, Annegret Glasow, Manja Kamprad, Markus Scholz, et Guido Hildebrandt. 2011. « Influence of low dose irradiation on differentiation, maturation and T-cell activation of human dendritic cells ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 709: 32–39.
- Jetten, Nadine, Sanne Verbruggen, Marion J. Gijbels, Mark J. Post, Menno P. J. De Winther, et Marjo M. P. C. Donners. 2014. « Anti-Inflammatory M2, but Not pro-Inflammatory M1 Macrophages Promote Angiogenesis in Vivo ». *Angiogenesis* 17 (1): 109-18. <https://doi.org/10.1007/s10456-013-9381-6>.
- Jia, Ting, Natalya V Serbina, Katharina Brandl, Maggie X Zhong, Ingrid M Leiner, Israel F Charo, et Eric G Pamer. 2008. « Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection ». *The Journal of Immunology* 180 (10): 6846–6853.
- Joiner, MC, P Lambin, EP Malaise, T Robson, JE Arrand, KA Skov, et Brian Marples. 1996. « Hypersensitivity to very-low single radiation doses: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 358 (2): 171–183.
- Joiner, Michael C, Philippe Lambin, et Brian Marples. 1999. « Adaptive response and induced resistance ». *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie* 322 (2-3): 167–175.
- Jongstra-Bilen, Jenny, Mehran Haidari, Su-Ning Zhu, Mian Chen, Daipayan Guha, et Myron I Cybulsky. 2006. « Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis ». *The Journal of experimental medicine* 203 (9): 2073–2083.
- Kallioulas, George D, et Lionel B Ivashkiv. 2016. « TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies ». *Nature Reviews Rheumatology* 12 (1): 49–62.
- Kamari, Yehuda, Aviv Shaish, Shay Shemesh, Einav Vax, Itamar Grosskopf, Shahar Dotan, Malka White, et al. 2011. « Reduced atherosclerosis and inflammatory cytokines in apolipoprotein-E-deficient mice

lacking bone marrow-derived interleukin-1 α ». *Biochemical and biophysical research communications* 405 (2): 197–203.

- Kanters, Edwin, Marion J. J. Gijbels, Ingeborg van der Made, Monique N. Vergouwe, Peter Heeringa, Georg Kraal, Marten H. Hofker, et Menno P. J. de Winther. 2004. « Hematopoietic NF-KB1 Deficiency Results in Small Atherosclerotic Lesions with an Inflammatory Phenotype ». *Blood* 103 (3): 934-40. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1450>.
- Kern, Peter M., Ludwig Keilholz, Christian Forster, Rupert Hallmann, Martin Herrmann, et Michael-Heinrich Seegenschmiedt. 2000. « Low-Dose Radiotherapy Selectively Reduces Adhesion of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Endothelium in Vitro ». *Radiotherapy and Oncology* 54 (3): 273-82. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(00\)00141-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(00)00141-9).
- Kim, Jae-Sung, Jong Wook Chang, Jong Kuk Park, et Sang-Gu Hwang. 2012. « Increased aldehyde reductase expression mediates acquired radioresistance of laryngeal cancer cells via modulating p53 ». *Cancer biology & therapy* 13 (8): 638–646.
- King, Victoria L, Lisa A Cassis, et Alan Daugherty. 2007. « Interleukin-4 does not influence development of hypercholesterolemia or angiotensin II-induced atherosclerotic lesions in mice ». *The American journal of pathology* 171 (6): 2040–2047.
- Kinkade, Kara, Jennifer Streeter, et Francis J Miller. 2013. « Inhibition of NADPH oxidase by apocynin attenuates progression of atherosclerosis ». *International journal of molecular sciences* 14 (8): 17017–17028.
- Kirii, Hirokazu, Tamikazu Niwa, Yasuhiro Yamada, Hisayasu Wada, Kuniaki Saito, Yoichiro Iwakura, Masahide Asano, Hisataka Moriwaki, et Mitsuru Seishima. 2003a. « Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23 (4): 656–660.
- . 2003b. « Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23 (4): 656–660.
- Klug, Felix, Hridayesh Prakash, Peter E Huber, Tobias Seibel, Noemi Bender, Niels Halama, Christina Pfirschke, et al. 2013. « Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS+/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy ». *Cancer cell* 24 (5): 589–602.
- Kobayashi, Koichi S, et Peter J Van Den Elsen. 2012. « NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses ». *Nature Reviews Immunology* 12 (12): 813–820.
- Kojima, S, S Matsumori, H Ishida, et Kiyonori Yamaoka. 2000. « Possible role of elevation of glutathione in the acquisition of enhanced proliferation of mouse splenocytes exposed to small-dose gamma-rays. » *International journal of radiation biology* 76 (12): 1641–1647.
- Kojima, Shuji. 2006. « Induction of glutathione and activation of immune functions by low-dose, whole-body irradiation with gamma-rays ». *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 126 (10): 849–857.
- Koltsova, Ekaterina K, Zacarias Garcia, Grzegorz Chodaczek, Michael Landau, Sara McArdle, Spencer R Scott, Sibylle von Vietinghoff, et al. 2012. « Dynamic T cell–APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis ». *The Journal of clinical investigation* 122 (9): 3114–3126.
- Kraaijeveld, Adriaan O, SC A de Jager, TJ C van Berkel, EA L Biessen, et J Wouter Jukema. 2007. « Chemokines and atherosclerotic plaque progression: towards therapeutic targeting? » *Current pharmaceutical design* 13 (10): 1039–1052.
- Krausgruber, Thomas, Katrina Blazek, Tim Smallie, Saba Alzabin, Helen Lockstone, Natasha Sahgal, Tracy Hussell, Marc Feldmann, et Irina A Udalova. 2011. « IRF5 Promotes Inflammatory Macrophage Polarization and TH1-TH17 Responses ». *Nature Immunology* 12 (3): 231-38. <https://doi.org/10.1038/ni.1990>.

- Kuchibhotla, Sai, Difernando Vanegas, David J Kennedy, Ella Guy, George Nimako, Richard E Morton, et Maria Febbraio. 2008. « Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor AI/II ». *Cardiovascular research* 78 (1): 185–196.
- Kunjathoor, Vidya V, Maria Febbraio, Eugene A Podrez, Kathryn J Moore, Lorna Andersson, Stephanie Koehn, Jeongmi S Rhee, Roy Silverstein, Henry F Hoff, et Mason W Freeman. 2002. « Scavenger receptors class AI/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (51): 49982–49988.
- Kurihara, Takao, Glenn Warr, James Loy, et Rodrigo Bravo. 1997. « Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor ». *The Journal of experimental medicine* 186 (10): 1757–1762.
- Kuziel, William A, Sharon J Morgan, Tracey C Dawson, Stephanie Griffin, Oliver Smithies, Klaus Ley, et Nobuyo Maeda. 1997. « Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (22): 12053–12058.
- Le Gallic, Clélia, Yohann Phalente, Line Manens, Isabelle Dublineau, Marc Benderitter, Yann Gueguen, Stephanie Lehoux, et Teni G. Ebrahimian. 2015a. « 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.
- . 2015b. « Chronic Internal Exposure to Low Dose 137Cs Induces Positive Impact on the Stability of Atherosclerotic Plaques by Reducing Inflammation in ApoE^{-/-} Mice ». Édité par Esther Lutgens. *PLOS ONE* 10 (6): e0128539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128539>.
- Lee, Bonggi, Liping Qiao, Min Lu, Hyung Sun Yoo, Wai Cheung, Robert Mak, Jerome Schaack, et al. 2014. « C/EBP α regulates macrophage activation and systemic metabolism ». *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 306 (10): E1144-54. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00002.2014>.
- Lee, Cheol Whan, Ilseon Hwang, Chan-Sik Park, Hyangsin Lee, Duk-Woo Park, Soo-Jin Kang, Seung-Whan Lee, Young-Hak Kim, Seong-Wook Park, et Seung-Jung Park. 2013. « Macrophage Heterogeneity of Culprit Coronary Plaques in Patients With Acute Myocardial Infarction or Stable Angina ». *American Journal of Clinical Pathology* 139 (3): 317-22. <https://doi.org/10.1309/AJCP7KEYGN3OBGQX>.
- Lee, Tzong-Shyuan, Hwei-Chen Yen, Ching-Chien Pan, et Lee-Young Chau. 1999. « The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19 (3): 734–742.
- Legein, Bart, Lieve Temmerman, Erik AL Biessen, et Esther Lutgens. 2013. « Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (20): 3847–3869.
- « L'exposition de la population française à la radioactivité ». s.d. Consulté le 23 avril 2020. <https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/exposition-population/exposition-population-france-metropole/Pages/0-Exposition-population-France-Sommaire.aspx#.XqFvZ5ngrV8>.
- Ley, Klaus, Carlo Laudanna, Myron I Cybulsky, et Sussan Nourshargh. 2007. « Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated ». *Nature Reviews Immunology* 7 (9): 678–689.
- Li, Jie, Sara McArdle, Amin Gholami, Takayuki Kimura, Dennis Wolf, Teresa Gerhardt, Jacqueline Miller, Christian Weber, et Klaus Ley. 2016. « CCR5+ T-bet+ FoxP3+ effector CD4 T cells drive atherosclerosis ». *Circulation research* 118 (10): 1540–1552.
- Li, XJ, Y Yang, XY Li, et SZ Liu. 1999. « Immunologic mechanisms of reduction of radiation-induced thymic lymphoma by low dose radiation ». In *J Radiat Res Radiat Proc*, 17:125–128.

- Liao, Xudong, Nikunj Sharma, Fehmida Kapadia, Guangjin Zhou, Yuan Lu, Hong Hong, Kaavya Paruchuri, et al. 2011. « Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (7): 2736-49. <https://doi.org/10.1172/JCI45444>.
- Libby, P., P. M. Ridker, et G. K. Hansson. 2009. « Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice ». *Journal of the American College of Cardiology* 54 (23): 2129-38. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.009>.
- Liebmann, André, Marion Hindemith, Jutta Jahns, Petra Madaj-Sterba, Sigrid Weisheit, Friedrich Kamprad, et Guido Hildebrandt. 2004. « Low-Dose X-Irradiation Of Adjuvant-Induced Arthritis in Rats ». *Strahlentherapie Und Onkologie* 180 (3): 165-72. <https://doi.org/10.1007/s00066-004-1197-2>.
- Lim, Ryan S, Jeffrey L Suhaimi, Shinobu Miyazaki-Anzai, Makoto Miyazaki, Moshe Levi, Eric O Potma, et Bruce J Tromberg. 2011. « Identification of cholesterol crystals in plaques of atherosclerotic mice using hyperspectral CARS imaging ». *Journal of lipid research* 52 (12): 2177–2186.
- Lingrel, Jerry B, Robyn Pilcher-Roberts, Joshua E. Basford, Palanikumar Manoharan, Jon Neumann, Eddy S. Konanah, Ramprasad Srinivasan, Vladimir Y Bogdanov, et David Y. Hui. 2012. « Myeloid-Specific Krüppel-Like Factor 2 Inactivation Increases Macrophage and Neutrophil Adhesion and Promotes Atherosclerosis ». *Circulation Research* 110 (10): 1294-1302. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.267310>.
- Little, Mark P, Richard Wakeford, E Janet Tawn, Simon D Bouffler, et Amy Berrington de Gonzalez. 2009. « Risks associated with low doses and low dose rates of ionizing radiation: why linearity may be (almost) the best we can do ». *Radiology* 251 (1): 6–12.
- Liu, Cuiqing, Rajagopal Desikan, Zhekang Ying, Liubov Gushchina, Thomas Kampfrath, Jeffrey Deiluis, Aixia Wang, et al. 2012. « Effects of a novel pharmacologic inhibitor of myeloperoxidase in a mouse atherosclerosis model ». *PloS one* 7 (12): e50767.
- Liu, Rongjun, Shudao Xiong, Lei Zhang, et Yiwei Chu. 2010a. « Enhancement of antitumor immunity by low-dose total body irradiation is associated with selectively decreasing the proportion and number of T regulatory cells ». *Cellular & molecular immunology* 7 (2): 157–162.
- . 2010b. « Enhancement of antitumor immunity by low-dose total body irradiation is associated with selectively decreasing the proportion and number of T regulatory cells ». *Cellular & molecular immunology* 7 (2): 157–162.
- Liu, SZ, ZB Han, et WH Liu. 1994. « Changes in lymphocyte reactivity to modulatory factors following low dose ionizing radiation. » *Biomedical and environmental sciences: BES* 7 (2): 130–135.
- Liu, SZ, YC Zhang, Y Zhao, et others. 1994. « Signal transduction in lymphocytes after low dose radiation. » *Chinese medical journal* 107 (6): 431–436.
- Luckey, Thomas D. 1982. « Physiological benefits from low levels of ionizing radiation. » *Health Physics* 43 (6): 771–789.
- . 2020. *Radiation hormesis*. CRC press.
- Ludewig, Burkhard, Stefan Freigang, Martin Jäggi, Michael O Kurrer, Yao-Chang Pei, Lenka Vlk, Bernhard Odermatt, Rolf M Zinkernagel, et Hans Hengartner. 2000. « Linking immune-mediated arterial inflammation and cholesterol-induced atherosclerosis in a transgenic mouse model ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (23): 12752–12757.
- Lutgens, Esther, et Mat JAP Daemen. 2001. *Transforming growth factor-β: a local or systemic mediator of plaque stability?* Am Heart Assoc.
- Maganto-García, Elena, Margarite L Tarrío, Nir Grabie, De-xiu Bu, et Andrew H Lichtman. 2011. « Dynamic changes in regulatory T cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia ». *Circulation* 124 (2): 185–195.

- Mahabeleshwar, Ganapati H., Daiji Kawanami, Nikunj Sharma, Yoichi Takami, Guangjin Zhou, Hong Shi, Lalitha Nayak, et al. 2011. « The Myeloid Transcription Factor KLF2 Regulates the Host Response to Polymicrobial Infection and Endotoxic Shock ». *Immunity* 34 (5): 715-28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.04.014>.
- Mailer, Reiner KW, Anton Gister\aa, Konstantinos A Polyzos, Daniel FJ Ketelhuth, et Göran K Hansson. 2017. « Hypercholesterolemia induces differentiation of regulatory T cells in the liver ». *Circulation research* 120 (11): 1740–1753.
- Mallat, Ziad, Sandrine Besnard, Micheline Duriez, Virginie Deleuze, Florence Emmanuel, Michel F Bureau, Fabienne Soubrier, et al. 1999. « Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis ». *Circulation research* 85 (8): e17–e24.
- Mallat, Ziad, Anne Corbaz, Alexandra Scoazec, Sandrine Besnard, Guy Lesèche, Yolande Chvatchko, et Alain Tedgui. 2001. « Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability ». *Circulation* 104 (14): 1598–1603.
- Mallat, Ziad, Andrea Gojova, Valérie Brun, Bruno Esposito, Nathalie Fournier, Françoise Cottrez, Alain Tedgui, et Hervé Groux. 2003. « Induction of a Regulatory T Cell Type 1 Response Reduces the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Knockout Mice ». *Circulation* 108 (10): 1232-37. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000089083.61317.A1>.
- Mancuso, Mariateresa, Emanuela Pasquali, Ignacia Braga-Tanaka, Satoshi Tanaka, Alessandro Pannicelli, Paola Giardullo, Simonetta Pazzaglia, Soile Tapio, Michael J Atkinson, et Anna Saran. 2015. « Acceleration of Atherogenesis in *ApoE*^{fl/fl} Mice Exposed to Acute or Low-Dose-Rate Ionizing Radiation ». *Oncotarget* 6 (31). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5075>.
- Mancuso, Mariateresa, Emanuela Pasquali, Ignacia Braga-Tanaka III, Satoshi Tanaka, Alessandro Pannicelli, Paola Giardullo, Simonetta Pazzaglia, Soile Tapio, Michael J. Atkinson, et Anna Saran. 2015. « Acceleration of atherogenesis in ApoE^{-/-} mice exposed to acute or low-dose-rate ionizing radiation ». *Oncotarget* 6 (31): 31263.
- Manning-Tobin, Jennifer J, Kathryn J Moore, Tracie A Seimon, Susan A Bell, Maia Sharuk, Jacqueline I Alvarez-Leite, Menno PJ de Winther, Ira Tabas, et Mason W Freeman. 2009. « Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29 (1): 19–26.
- Mantovani, Alberto, Marco A Cassatella, Claudio Costantini, et Sébastien Jaillon. 2011. « Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity ». *Nature reviews immunology* 11 (8): 519–531.
- Martinez, Fernando O, et Siamon Gordon. 2014. « The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment ». *F1000prime reports* 6.
- Martinez, Fernando O, Siamon Gordon, Massimo Locati, et Alberto Mantovani. s. d. « Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression », 10.
- Mattson, Mark P. 2008. « Hormesis defined ». *Ageing research reviews* 7 (1): 1–7.
- Maxfield, Frederick R, et Ira Tabas. 2005. « Role of cholesterol and lipid organization in disease ». *Nature* 438 (7068): 612–621.
- McGale, Paul, Sarah C. Darby, Per Hall, Jan Adolfsson, Nils-Olof Bengtsson, Anna M. Bennet, Tommy Fornander, Bruna Gigante, Maj-Britt Jensen, et Richard Peto. 2011. « Incidence of heart disease in 35,000 women treated with radiotherapy for breast cancer in Denmark and Sweden ». *Radiotherapy and Oncology* 100: 167-75.

- Miller, Yury I, Soo-Ho Choi, Philipp Wiesner, Longhou Fang, Richard Harkewicz, Karsten Hartvigsen, Agnès Boullier, et al. 2011. « Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity ». *Circulation research* 108 (2): 235–248.
- Mills, Kingston HG. 2008. « Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells ». *European journal of immunology* 38 (10): 2636–2649.
- Mitchel, R. E. J., M. Hasu, M. Bugden, H. Wyatt, G. Hildebrandt, Y. X. Chen, N. D. Priest, et S. C. Whitman. 2013. « Low-Dose Radiation Exposure and Protection Against Atherosclerosis in ApoE^{-/-}Mice: The Influence of P53 Heterozygosity ». *Radiation research* 179 (2): 190-99.
- Mitchel, R. E. J., M. Hasu, M. Bugden, H. Wyatt, M. P. Little, A. Gola, G. Hildebrandt, N. D. Priest, et S. C. Whitman. 2011. « Low-dose radiation exposure and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice ». *Radiation research* 175 (5): 665-76.
- Montecucco, Fabrizio, Sébastien Lenglet, Angele Gayet-Ageron, Maria Bertolotto, Graziano Pelli, Domenico Palombo, Bianca Pane, et al. 2010. « Systemic and intraplaque mediators of inflammation are increased in patients symptomatic for ischemic stroke ». *Stroke* 41 (7): 1394–1404.
- Moore, Kathryn J, Frederick J Sheedy, et Edward A Fisher. 2013. « Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance ». *Nature Reviews Immunology* 13 (10): 709–721.
- Moore, Kevin W, Rene de Waal Malefyt, Robert L Coffman, et Anne O'Garra. 2001. « Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor ». *Annual review of immunology* 19 (1): 683–765.
- Moos, Michael PW, Nicole John, Rolf Gräbner, Silke Noßmann, Bernd Günther, Rüdiger Vollandt, Colin D Funk, Brigitte Kaiser, et Andreas JR Habenicht. 2005. « The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25 (11): 2386–2391.
- Mosman, Tim R. 1994. « Properties and functions of interleukin-10 ». *Advances in immunology* 56: 1-26.
- Mosmann, T. R. 1994. « Properties and Functions of Interleukin-10 ». *Advances in Immunology* 56: 1-26.
- Mosser, David M. 2003. « The Many Faces of Macrophage Activation ». *Journal of Leukocyte Biology* 73 (2): 209-12. <https://doi.org/10.1189/jlb.0602325>.
- Mosser, David M., et Justin P. Edwards. 2008. « Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation ». *Nature Reviews Immunology* 8 (12): 958-69. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- Mossman, Kenneth L. 1998. « The linear no-threshold debate: Where do we go from here? ». *Medical physics* 25 (3): 279–284.
- Mulrooney, Daniel A., Gregory T. Armstrong, Sujuan Huang, Kirsten K. Ness, Matthew J. Ehrhardt, Vijaya M. Joshi, Juan Carlos Plana, Elsayed Z. Soliman, Daniel M. Green, et Deokumar Srivastava. 2016. « Cardiac outcomes in adult survivors of childhood cancer exposed to cardiotoxic therapy: a cross-sectional study ». *Annals of internal medicine* 164: 93-101.
- Mulrooney, Daniel A, Mark W Yeazel, Toana Kawashima, Ann C Mertens, Pauline Mitby, Marilyn Stovall, Sarah S Donaldson, et al. 2009. « Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort ». *Bmj* 339.
- Nahrendorf, Matthias, Filip K Swirski, Elena Aikawa, Lars Stangenberg, Thomas Wurdinger, Jose-Luiz Figueiredo, Peter Libby, Ralph Weissleder, et Mikael J Pittet. 2007. « The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions ». *The Journal of experimental medicine* 204 (12): 3037–3047.

- Nakashima, Yutaka, Andrew S. Plump, Elaine W. Raines, Jan L. Breslow, et Russell Ross. 1994a. « ApoE-deficient Mice Develop Lesions of All Phases of Atherosclerosis Throughout the Arterial Tree ». *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology* 14 (1): 133-40.
- Nakashima, Yutaka, Andrew S Plump, Elaine W Raines, Jan L Breslow, et Russell Ross. 1994b. « ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. » *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology* 14 (1): 133-140.
- Nakatsukasa, Hiroko, Mitsutoshi Tsukimoto, Akihiro Tokunaga, et Shuji Kojima. 2010. « Repeated gamma irradiation attenuates collagen-induced arthritis via up-regulation of regulatory T cells but not by damaging lymphocytes directly ». *Radiation research* 174 (3): 313-24.
- Naruko, Takahiko, Makiko Ueda, Kazuo Haze, Allard C van der Wal, Chris M van der Loos, Akira Itoh, Ryushi Komatsu, et al. 2002. « Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes ». *Circulation* 106 (23): 2894-2900.
- Nasri, Hamid. 2012. « Association of Ca²⁺ PO₄ product with levels of serum C-reactive protein in regular hemodialysis patients ». *Journal of renal injury prevention* 1 (2): 55.
- Nayer, Ali, et Arif Asif. 2013. « Idiopathic membranous nephropathy and anti-phospholipase A2 receptor antibodies ». *Journal of nephropathology* 2 (4): 214.
- Nayer, Ali, et Luis M Ortega. 2014. « Catastrophic antiphospholipid syndrome: a clinical review ». *Journal of Nephropathology* 3 (1): 9.
- Nurieva, Roza I, Xikui Liu, et Chen Dong. 2009. « Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function ». *Immunological reviews* 229 (1): 88-100.
- Ohta, Hiroto, Hisayasu Wada, Tamikazu Niwa, Hirokazu Kirii, Naoki Iwamoto, Hidehiko Fujii, Kuniaki Saito, Kenji Sekikawa, et Mitsuru Seishima. 2005a. « Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice ». *Atherosclerosis* 180 (1): 11-17.
- . 2005b. « Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice ». *Atherosclerosis* 180 (1): 11-17.
- Olivieri, G. 1999. « Adaptive response and its relationship to hormesis and low dose cancer risk estimation ». *Human & experimental toxicology* 18 (7): 440-442.
- Osipov, AN, NI Ryabchenko, BP Ivannik, LA Dzikovskaya, VI Ryabchenko, et G Ya Kolomijtseva. 2003. « A prior administration of heavy metals reduces thymus lymphocyte DNA lesions and lipid peroxidation in gamma-irradiated mice ». In *Journal de Physique IV (Proceedings)*, 107:987-992. EDP sciences.
- Owen, DRJ, AC Lindsay, RP Choudhury, et ZA Fayad. 2011. « Imaging of atherosclerosis ». *Annual review of medicine* 62: 25-40.
- Packard, René RS, Elena Maganto-García, Israel Gotsman, Ira Tabas, Peter Libby, et Andrew H Lichtman. 2008. « CD11c⁺ dendritic cells maintain antigen processing, presentation capabilities, and CD4⁺ T-cell priming efficacy under hypercholesterolemic conditions associated with atherosclerosis ». *Circulation research* 103 (9): 965-973.
- Palframan, Roger T, Steffen Jung, Guiying Cheng, Wolfgang Weninger, Yi Luo, Martin Dorf, Dan R Littman, et al. 2001a. « Inflammatory chemokine transport and presentation in hev a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues ». *Journal of Experimental Medicine* 194 (9): 1361-1374.
- . 2001b. « Inflammatory chemokine transport and presentation in hev a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues ». *Journal of Experimental Medicine* 194 (9): 1361-1374.

- Pandey, Ruchi, Bhavani S Shankar, Deepak Sharma, et Krishna B Sainis. 2005. « Low dose radiation induced immunomodulation: effect on macrophages and CD8+ T cells ». *International journal of radiation biology* 81 (11): 801–812.
- Patel, Shilpesh S, Ram Thiagarajan, James T Willerson, et Edward TH Yeh. 1998. « Inhibition of $\alpha 4$ integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice ». *Circulation* 97 (1): 75–81.
- Paulson, Kim E, Su-Ning Zhu, Mian Chen, Sabrina Nurmohamed, Jenny Jongstra-Bilen, et Myron I Cybulsky. 2010. « Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis ». *Circulation research* 106 (2): 383–390.
- Paulsson, Gabrielle, Xinghua Zhou, Elisabeth Törnquist, et Göran K Hansson. 2000. « Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20 (1): 10–17.
- Pende, Aldo, Nathan Artom, Maria Bertolotto, Fabrizio Montecucco, et Franco Dallegri. 2016. « Role of neutrophils in atherogenesis: an update ». *European journal of clinical investigation* 46 (3): 252–263.
- Piedrahita, Jorge A, Sunny H Zhang, John R Hagan, Paula M Oliver, et Nobuyo Maeda. 1992. « Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (10): 4471–4475.
- Pinderski Oslund, Laura J, Catherine C Hedrick, Tristana Olvera, Amy Hagenbaugh, Mary Territo, Judith A Berliner, et Alistair I Fyfe. 1999. « Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19 (12): 2847–2853.
- Plump, Andrew S., et Pek Yee Lum. 2009. « Genomics and cardiovascular drug development ». *Journal of the American College of Cardiology* 53 (13): 1089–1100.
- Podrez, Eugene A, David Schmitt, Henry F Hoff, et Stanley L Hazen. 1999. « Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro ». *The Journal of clinical investigation* 103 (11): 1547–1560.
- Pollycove, Myron, et Ludwig E Feinendegen. 2003. « Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage ». *Human & experimental toxicology* 22 (6): 290–306.
- Porta, C., M. Rimoldi, G. Raes, L. Brys, P. Ghezzi, D. Di Liberto, F. Dieli, et al. 2009. « Tolerance and M2 (Alternative) Macrophage Polarization Are Related Processes Orchestrated by P50 Nuclear Factor B ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (35): 14978–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809784106>.
- Potteaux, Stephane, Christophe Combadiere, Adeline Pezard, Stephanie Riou, Tabassome Simon, Mathieu Rodero, Bruno Esposito, et al. 2007. *Combined inhibition of Ccl2, Cx3cr1 and Ccr5 abrogates Ly6chi and Ly6clo monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice*. Am Heart Assoc.
- Prasad, Adapa V, Natarajan Mohan, Bysani Chandrasekar, et Martin L Meltz. 1994. « Activation of nuclear factor κB in human lymphoblastoid cells by low-dose ionizing radiation ». *Radiation research* 138 (3): 367–372.
- Qu, Chunfeng, Emmerson W Edwards, Frank Tacke, Véronique Angeli, Jaime Llodrá, Guzman Sanchez-Schmitz, Alexandre Garin, et al. 2004. « Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes ». *The Journal of experimental medicine* 200 (10): 1231–1241.
- Radiation Protection No 158. 2008. « Working Party on Research Implications on Health and Safety SotAGoE: Emerging evidence for radiation induced circulatory diseases. » EU Scientific Seminar 2008.

- Rafieian-Kopaei, Mahmoud, et Azar Baradaran. 2013. « Combination of metformin with other antioxidants may increase its renoprotective efficacy. » *Journal of renal injury prevention* 2 (2): 35–6.
- Rafieian-Kopaei, Mahmoud, Mahbubeh Setorki, Monir Doudi, Azar Baradaran, et Hamid Nasri. 2014. « Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes ». *International journal of preventive medicine* 5 (8): 927.
- Rahman, Karishma, Yuliya Vengrenyuk, Stephen A. Ramsey, Noemi Rotllan Vila, Natasha M. Girgis, Jianhua Liu, Viktoria Gusarova, Jesper Gromada, Ada Weinstock, et Kathryn J. Moore. 2017. « Inflammatory Ly6C hi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression ». *The Journal of clinical investigation* 127 (8): 2904-15.
- Randolph, Gwendalyn J. 2008. « Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis ». *Current opinion in lipidology* 19 (5): 462.
- Ranjbaran, Hooman, Seth I Sokol, Amy Gallo, Raymond E Eid, Alexander O Iakimov, Alessio D'Alessio, John R Kapoor, et al. 2007. « An inflammatory pathway of IFN- γ production in coronary atherosclerosis ». *The Journal of Immunology* 178 (1): 592–604.
- Rauscher, Frederick M, Pascal J Goldschmidt-Clermont, Bryce H Davis, Tao Wang, David Gregg, Priya Ramaswami, Anne M Pippen, Brian H Annex, Chunming Dong, et Doris A Taylor. 2003. « Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis ». *Circulation* 108 (4): 457–463.
- Ray, Anuradha, Anupriya Khare, Nandini Krishnamoorthy, Zengbiao Qi, et Prabir Ray. 2010. « Regulatory T cells in many flavors control asthma ». *Mucosal immunology* 3 (3): 216–229.
- Rizvi, Asma, Michael J Pecaut, James M Slater, Shruti Subramaniam, et Daila S Gridley. 2011. « Low-dose γ -rays modify CD4+ T cell signalling response to simulated solar particle event protons in a mouse model ». *International journal of radiation biology* 87 (1): 24–35.
- Robbins, Clinton S, Aleksey Chudnovskiy, Philipp J Rauch, Jose-Luiz Figueiredo, Yoshiko Iwamoto, Rostic Gorbatov, Martin Etzrodt, et al. 2012. « Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6Chigh monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions ». *Circulation* 125 (2): 364–374.
- Robbins, Clinton S, Ingo Hilgendorf, Georg F Weber, Igor Theurl, Yoshiko Iwamoto, Jose-Luiz Figueiredo, Rostic Gorbatov, et al. 2013. « Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis ». *Nature medicine* 19 (9): 1166.
- Robertson, Anna-Karin L, Mats Rudling, Xinghua Zhou, Leonid Gorelik, Richard A Flavell, Göran K Hansson, et others. 2003. « Disruption of TGF- β signaling in T cells accelerates atherosclerosis ». *The Journal of clinical investigation* 112 (9): 1342–1350.
- Rödel, Franz, Ulrich Schaller, Stefan Schultze-Mosgau, Horst-Ulrich Beuscher, Ludwig Keilholz, Martin Herrmann, Reinhard Voll, Rolf Sauer, et Guido Hildebrandt. 2004. « The induction of TGF- β 1 and NF- κ B parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation ». *Strahlentherapie und Onkologie* 180 (4): 194–200.
- Roedel, F., N. Kley, H. U. Beuscher, G. Hildebrandt, L. Keilholz, P. Kern, R. Voll, M. Herrmann, et R. Sauer. 2002. « Anti-Inflammatory Effect of Low-Dose X-Irradiation and the Involvement of a TGF-Beta1-Induced down-Regulation of Leukocyte/Endothelial Cell Adhesion ». *International Journal of Radiation Biology* 78 (8): 711-19. <https://doi.org/10.1080/09553000210137671>.
- Ross, Russell. 1993. « The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s ». *Nature* 362 (6423): 801–809.
- Ruffell, D., F. Mourkioti, A. Gambardella, P. Kirstetter, R. G. Lopez, N. Rosenthal, et C. Nerlov. 2009. « A CREB-C/EBP Cascade Induces M2 Macrophage-Specific Gene Expression and Promotes Muscle Injury Repair ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (41): 17475-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908641106>.

- Samson, M-Aubry, et F-Parmentier. 1999. « Que sont les chimiokines ? », 1999, Med Sci édition.
- Sanchez-Madrid, F, P Simon, S Thompson, et TA Springer. 1983. « Mapping of antigenic and functional epitopes on the alpha-and beta-subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell interactions, LFA-1 and Mac-1. » *The Journal of experimental medicine* 158 (2): 586–602.
- Satoh, Takashi, Osamu Takeuchi, Alexis Vandenbon, Koubun Yasuda, Yoshiaki Tanaka, Yutaro Kumagai, Tohru Miyake, et al. 2010. « The Jmjd3-Irf4 Axis Regulates M2 Macrophage Polarization and Host Responses against Helminth Infection ». *Nature Immunology* 11 (10): 936–44. <https://doi.org/10.1038/ni.1920>.
- Sawant, Deepali V, et Dario AA Vignali. 2014. « Once a Treg, always a Treg? » *Immunological reviews* 259 (1): 173–191.
- Schaue, D., B. Marples, et K. R. Trott. 2002a. « The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages ». *International Journal of Radiation Biology* 78 (7): 567-76. <https://doi.org/10.1080/09553000210126457>.
- Schaue, D., Brian Marples, et K. R. Trott. 2002b. « The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages ». *International journal of radiation biology* 78 (7): 567-76.
- Schaue, Dörthe, Jutta Jahns, Guido Hildebrandt, et Klaus-Rüdiger Trott. 2005a. « Radiation treatment of acute inflammation in mice ». *International journal of radiation biology* 81 (9): 657-67.
- . 2005b. « Radiation treatment of acute inflammation in mice ». *International Journal of Radiation Biology* 81 (9): 657-67. <https://doi.org/10.1080/09553000500385556>.
- Schöllnberger, Helmut, Markus Eidemüller, Harry M. Cullings, Cristoforo Simonetto, Frauke Neff, et Jan Christian Kaiser. 2018. « Dose-Responses for Mortality from Cerebrovascular and Heart Diseases in Atomic Bomb Survivors: 1950–2003 ». *Radiation and Environmental Biophysics* 57 (1): 17-29. <https://doi.org/10.1007/s00411-017-0722-5>.
- Schröder, Sabine, Dajana Juerß, Stephan Kriesen, Katrin Manda, et Guido Hildebrandt. 2019. « Immunomodulatory properties of low-dose ionizing radiation on human endothelial cells ». *International journal of radiation biology* 95 (1): 23–32.
- Schulz, Christian, Elisa Gomez Perdiguero, Laurent Chorro, Heather Szabo-Rogers, Nicolas Cagnard, Katrin Kierdorf, Marco Prinz, et al. 2012. « A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells ». *Science* 336 (6077): 86–90.
- Sedgwick, Barbara, et Tomas Lindahl. 2002. « Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage ». *Oncogene* 21 (58): 8886–8894.
- Serbina, Natalya V, Ting Jia, Tobias M Hohl, et Eric G Pamer. 2008. « Monocyte-mediated defense against microbial pathogens ». *Annu. Rev. Immunol.* 26: 421–452.
- Shankar, Bhavani, et Krishna B. Sainis. 2005. « Cell cycle regulators modulating con A mitogenesis and apoptosis in low-dose radiation-exposed mice ». *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology* 24 (1).
- Shankman, Laura S, Delphine Gomez, Olga A Cherepanova, Morgan Salmon, Gabriel F Alencar, Ryan M Haskins, Pamela Swiatlowska, et al. 2015. « KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis ». *Nature medicine* 21 (6): 628–637.
- Sharma, Shilpa, Neha Singla, Vijayta Dani Chadha, et DK Dhawan. 2019. « A concept of radiation hormesis: stimulation of antioxidant machinery in rats by low dose ionizing radiation. » *Hellenic journal of nuclear medicine* 22 (1): 43–48.
- Shi, Chao, et Eric G Pamer. 2011. « Monocyte recruitment during infection and inflammation ». *Nature reviews immunology* 11 (11): 762–774.

- Shigematsu, Akio, Yasushi Adachi, Naoko Koike-Kiriyama, Yasuhiro Suzuki, Masayoshi Iwasaki, Yasushi Koike, Keiji Nakano, Hiromi Mukaide, Masahiro Imamura, et Susumu Ikehara. 2007. « Effects of low-dose irradiation on enhancement of immunity by dendritic cells ». *Journal of radiation research* 48 (1): 51–55.
- Shimizu, Yukiko, Kazunori Kodama, Nobuo Nishi, Fumiyoshi Kasagi, Akihiko Suyama, Midori Soda, Eric J Grant, et al. 2010. « Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950–2003 ». *Bmj* 340: b5349.
- Shin, Suk Chul, Kyung-Mi Lee, Yu Mi Kang, Kwanghee Kim, Cha Soon Kim, Kwang Hee Yang, Young-Woo Jin, Chong Soon Kim, et Hee Sun Kim. 2010. « Alteration of cytokine profiles in mice exposed to chronic low-dose ionizing radiation ». *Biochemical and biophysical research communications* 397 (4): 644–649.
- Sierra-Filardi, Elena, Miguel A. Vega, Paloma Sánchez-Mateos, Angel L. Corbí, et Amaya Puig-Kröger. 2010. « Heme Oxygenase-1 Expression in M-CSF-Polarized M2 Macrophages Contributes to LPS-Induced IL-10 Release ». *Immunobiology* 215 (9-10): 788-95. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.020>.
- Simionescu, Maya. 2007. « Implications of Early Structural-Functional Changes in the Endothelium for Vascular Disease ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (2): 266-74. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000253884.13901.e4>.
- Smith, Emily, Konkall-Matt R Prasad, Matthew Butcher, Anca Dobrian, Jay K Kolls, Klaus Ley, et Elena Galkina. 2010. « Blockade of IL-17A results in reduced atherosclerosis in Apoe-deficient mice ». *Circulation* 121 (15): 1746.
- Solovjov, Dmitry A, Elzbieta Pluskota, et Edward F Plow. 2005. « Distinct roles for the α and β subunits in the functions of integrin α M β 2 ». *Journal of biological chemistry* 280 (2): 1336–1345.
- Song, Kyung-Hee, Mi-Hyoung Kim, Seong-Mook Kang, Seung-Youn Jung, Jiyeon Ahn, Hee-Jong Woo, Seon Young Nam, Sang-Gu Hwang, Sang-Young Ryu, et Jie-Young Song. 2015. « Analysis of immune cell populations and cytokine profiles in murine splenocytes exposed to whole-body low-dose irradiation ». *International journal of radiation biology* 91 (10): 795–803.
- Sonn, Chung Hee, Jong Rip Choi, Tae-Jin Kim, Young-Bin Yu, Kwanghee Kim, Suk Chul Shin, Gil-Hong Park, Toshiro Shirakawa, Hee Sun Kim, et Kyung-Mi Lee. 2012. « Augmentation of natural cytotoxicity by chronic low-dose ionizing radiation in murine natural killer cells primed by IL-2 ». *Journal of radiation research* 53 (6): 823–829.
- Springer, Timothy A. 1996. « Traffic signals on endothelium for leukocytes in health inflammation and atherosclerosis ». *Atherosclerosis and coronary artery disease* 1: 511–538.
- Stein, M, S Keshav, N Harris, et S Gordon. 1992. « Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation. » *The Journal of Experimental Medicine* 176 (1): 287-92. <https://doi.org/10.1084/jem.176.1.287>.
- Steinbrecher, Urs P, Sampath Parthasarathy, David S Leake, Joseph L Witztum, et Daniel Steinberg. 1984. « Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (12): 3883–3887.
- Strauss-Ayali, Dalit, Sean M. Conrad, et David M. Mosser. 2007. « Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection ». *Journal of leukocyte biology* 82 (2): 244-52.
- Strom, Daniel J, John R Cameron, et Bernard L Cohen. 1998. « The LNT model is appropriate for the estimation of risk from low-level (less than 100 mSv/year) radiation, and low levels of radon in homes should be considered harmful to health. » *Medical physics* 25 (3): 273.
- Swain, Susan L, Linda M Bradley, Michael Croft, Susan Tonkonogy, Gus Atkins, Andrew D Weinberg, David D Duncan, Stephen M Hedrick, Richard W Dutton, et Gail Huston. 1991. « Helper T-cell subsets:

- phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. » *Immunological reviews* 123: 115–144.
- Swirski, Filip K, Peter Libby, Elena Aikawa, Pilar Alcaide, F William Luscinskas, Ralph Weissleder, Mikael J Pittet, et others. 2007. « Ly-6C hi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata ». *The Journal of clinical investigation* 117 (1): 195–205.
- Swirski, Filip K, Matthias Nahrendorf, Martin Etzrodt, Moritz Wildgruber, Virna Cortez-Retamozo, Peter Panizzi, Jose-Luiz Figueiredo, et al. 2009. « Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites ». *Science* 325 (5940): 612–616.
- Swirski, Filip K, Mikael J Pittet, Moritz F Kircher, Elena Aikawa, Farouc A Jaffer, Peter Libby, et Ralph Weissleder. 2006. « Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (27): 10340–10345.
- Szmitko, Paul E., Chao-Hung Wang, Richard D. Weisel, John R. de Almeida, Todd J. Anderson, et Subodh Verma. 2003. « New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation: Part I ». *Circulation* 108 (16): 1917-23. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000089190.95415.9F>.
- Tabas, Ira, Guillermo García-Cardeña, et Gary K. Owens. 2015. « Recent Insights into the Cellular Biology of Atherosclerosis ». *The Journal of Cell Biology* 209 (1): 13-22. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412052>.
- Tabas, Ira, et Andrew H. Lichtman. 2017. « Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis ». *Immunity* 47 (4): 621-34. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.008>.
- Tacke, Frank, David Alvarez, Theodore J Kaplan, Claudia Jakubzick, Rainer Spanbroek, Jaime Llodra, Alexandre Garin, et al. 2007. « Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques ». *The Journal of clinical investigation* 117 (1): 185–194.
- Taleb, S., A. Tedgui, et Z. Mallat. 2008. « Regulatory T-Cell Immunity and Its Relevance to Atherosclerosis ». *Journal of Internal Medicine* 263 (5): 489-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01944.x>.
- Taleb, Soraya, Mélissa Romain, Bhama Ramkhelawon, Catherine Uyttenhove, Gerard Pasterkamp, Olivier Herbin, Bruno Esposito, et al. 2009. « Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis ». *Journal of Experimental Medicine* 206 (10): 2067–2077.
- Tang, Feng Ru, et Weng Keong Loke. 2015. « Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability ». *International journal of radiation biology* 91 (1): 13–27.
- Tavafi, Majid. 2013. « Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations ». *Journal of renal injury prevention* 2 (2): 59.
- Tits, L. J. H. van, R. Stienstra, P. L. van Lent, M. G. Netea, L. a. B. Joosten, et A. F. H. Stalenhoef. 2011. « Oxidized LDL Enhances Pro-Inflammatory Responses of Alternatively Activated M2 Macrophages: A Crucial Role for Krüppel-like Factor 2 ». *Atherosclerosis* 214 (2): 345-49. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.018>.
- Tonini, Clarissa L, Bianca P Campagnaro, Lis PS Louro, Thiago Pereira, Elisardo C Vasquez, et Silvana S Meyrelles. 2013. « Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice ». *International journal of molecular sciences* 14 (2): 3325–3342.
- TROTT, G. HILDEBRANDT M. P. SEED C. N. FREEMANTLE C. A. S. ALAM P. R. COLVILLE-NASH K. R. 1998. « Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy ». *International Journal of Radiation Biology* 74 (3): 367-78. <https://doi.org/10.1080/095530098141500>.
- Trott, KR. s. d. « [The effect of x-rays on experimental arthritis in the rat] - Abstract - Europe PMC ». Consulté le 29 mai 2020. <https://europepmc.org/article/med/7570302>.

- Tsou, Chia-Lin, Wendy Peters, Yue Si, Sarah Slaymaker, Ara M Aslanian, Stuart P Weisberg, Matthias Mack, Israel F Charo, et others. 2007a. « Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites ». *The Journal of clinical investigation* 117 (4): 902–909.
- . 2007b. « Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites ». *The Journal of clinical investigation* 117 (4): 902–909.
- Tsukimoto, Mitsutoshi, Takujiro Homma, Yasuko Mutou, et Shuji Kojima. 2009a. « 0.5 Gy Gamma Radiation Suppresses Production of TNF-Alpha through up-Regulation of MKP-1 in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells ». *Radiation Research* 171 (2): 219–24. <https://doi.org/10.1667/RR1351.1>.
- . 2009b. « 0.5 Gy Gamma Radiation Suppresses Production of TNF-Alpha through up-Regulation of MKP-1 in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells ». *Radiation Research* 171 (2): 219–24. <https://doi.org/10.1667/RR1351.1>.
- Tubiana, Maurice, Ludwig E Feinendegen, Chichuan Yang, et Joseph M Kaminski. 2009. « The linear no-threshold relationship is inconsistent with radiation biologic and experimental data ». *Radiology* 251 (1): 13–22.
- Tupin, Emmanuel, Antonino Nicoletti, Rima Elhage, Mats Rudling, Hans-Gustaf Ljunggren, Göran K Hansson, et Gabrielle Paulsson Berne. 2004. « CD1d-dependent activation of NKT cells aggravates atherosclerosis ». *The Journal of experimental medicine* 199 (3): 417–422.
- Upton, Arthur C. 2001. « Radiation hormesis: data and interpretations ». *Critical reviews in toxicology* 31 (4-5): 681–695.
- Usui, Fumitake, Koumei Shirasuna, Hiroaki Kimura, Kazuki Tatsumi, Akira Kawashima, Tadayoshi Karasawa, Shigeaki Hida, Junji Sagara, Shun'ichiro Taniguchi, et Masafumi Takahashi. 2012. « Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice ». *Biochemical and biophysical research communications* 425 (2): 162–168.
- Van Es, T, GHM Van Puijvelde, OH Ramos, FME Segers, LA Joosten, WB van Den Berg, IM Michon, P De Vos, Th JC van Berkel, et J Kuiper. 2009. « Attenuated atherosclerosis upon IL-17R signaling disruption in LDLr deficient mice ». *Biochemical and biophysical research communications* 388 (2): 261–265.
- Vanbervliet, Béatrice, Bernhard Homey, Isabelle Durand, Catherine Massacrier, Smina Aït-Yahia, Odette de Bouteiller, Alain Vicari, et Christophe Caux. 2002. « Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces ». *European journal of immunology* 32 (1): 231–242.
- Veseli, Besa Emini, Paola Perrotta, Gregory RA De Meyer, Lynn Roth, Carole Van der Donckt, Wim Martinet, et Guido RY De Meyer. 2017. « Animal models of atherosclerosis ». *European journal of pharmacology* 816: 3–13.
- Wang, Baofeng, Baohua Li, Zhijun Dai, Song Ren, Minghua Bai, Zhongwei Wang, Zongfang Li, et al. 2014a. « Low-dose splenic radiation inhibits liver tumor development of rats through functional changes in CD4+ CD25+ Treg cells ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 55: 98–108.
- . 2014b. « Low-dose splenic radiation inhibits liver tumor development of rats through functional changes in CD4+ CD25+ Treg cells ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 55: 98–108.
- Wanrooij, Eva JA van, Gijs HM van Puijvelde, Paula de Vos, Hideo Yagita, Theo JC van Berkel, et Johan Kuiper. 2007. « Interruption of the Tnfrsf4/Tnfsf4 (OX40/OX40L) pathway attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27 (1): 204–210.

- Wanschel, Amarylis, Tara Seibert, Bernd Hewing, Bhama Ramkhelawon, Tathagat D. Ray, Janine M. van Gils, Katey J. Rayner, et al. 2013. « Neuroimmune Guidance Cue Semaphorin 3E Is Expressed in Atherosclerotic Plaques and Regulates Macrophage Retention ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (5): 886-93. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300941>.
- Weber, Christian, et Heidi Noels. 2011. « Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options ». *Nature medicine* 17 (11): 1410–1422.
- Weber, Christian, Kim SC Weber, Christiane Klier, Songhai Gu, Rudolf Wank, Richard Horuk, et Peter J Nelson. 2001. « Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and TH1-like/CD45RO+ T cells ». *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 97 (4): 1144–1146.
- Weber, Christian, Alma Zerneck, et Peter Libby. 2008. « The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models ». *Nature reviews immunology* 8 (10): 802–815.
- Weng, Ling, Richard O Williams, Pedro L Vieira, Gavin Sreaton, Marc Feldmann, et Francesco Dazzi. 2010. « The therapeutic activity of low-dose irradiation on experimental arthritis depends on the induction of endogenous regulatory T cell activity ». *Annals of the rheumatic diseases* 69 (8): 1519–1526.
- Westerterp, Marit, Emmanuel L Gautier, Anjali Ganda, Matthew M Molusky, Wei Wang, Panagiotis Fotakis, Nan Wang, et al. 2017. « Cholesterol accumulation in dendritic cells links the inflammasome to acquired immunity ». *Cell metabolism* 25 (6): 1294–1304.
- Whitman, Stewart C, Debra L Rateri, Stephen J Szilvassy, Wayne Yokoyama, et Alan Daugherty. 2004. « Depletion of natural killer cell function decreases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor null mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24 (6): 1049–1054.
- Whitman, Stewart C, Punnaivanam Ravisankar, et Alan Daugherty. 2002a. « IFN- γ deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/-mice ». *Journal of interferon & cytokine research* 22 (6): 661–670.
- . 2002b. « Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice through release of interferon- γ ». *Circulation research* 90 (2): e34–e38.
- Wigren, Maria, Jan Nilsson, et Daniel Kolbus. 2012. « Lymphocytes in atherosclerosis ». *Clinica Chimica Acta* 413 (19-20): 1562–1568.
- Wolff, Sheldon. 1998. « The adaptive response in radiobiology: Evolving insights and implications. » *Environmental Health Perspectives* 106 (suppl 1): 277–283.
- Wong, F Lennie, Michiko Yamada, Hideo Sasaki, Kazunori Kodama, et Yutaka Hosoda. 1999. « Effects of radiation on the longitudinal trends of total serum cholesterol levels in the atomic bomb survivors ». *Radiation research* 151 (6): 736–746.
- Woollard, Kevin J. 2005. « Soluble bio-markers in vascular disease: Much more than gauges of disease? » *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 32 (4): 233–240.
- Woollard, Kevin J, et Jaye Chin-Dusting. 2007. « Therapeutic targeting of p-selectin in atherosclerosis ». *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)* 6 (1): 69–74.
- Woollard, KJ, D Kling, Suhasini Kulkarni, Anthony M Dart, Shaun Jackson, et Jaye Chin-Dusting. 2006. « Raised plasma soluble P-selectin in peripheral arterial occlusive disease enhances leukocyte adhesion ». *Circulation research* 98 (1): 149–156.
- Wunderlich, R, A Ernst, F Rödel, R Fietkau, O Ott, K Lauber, B Frey, et US Gaipf. 2015. « 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 & Experimental Immunology* 179 (1): 50–61.

- Wuttge, Dirk M, Xinghua Zhou, Yuri Sheikine, Dick Wågsäter, Veronika Stemme, Ulf Hedin, Sten Stemme, Göran K Hansson, et Allan Sirsjö. 2004. « CXCL16/SR-PSOX is an interferon- γ -regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24 (4): 750–755.
- Xing, Zhou, Jack Gauldie, Gerard Cox, Heinz Baumann, Manel Jordana, Xue-Feng Lei, et Michelle K Achong. 1998. « IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. » *The Journal of clinical investigation* 101 (2): 311–320.
- Yang, Guozi, Qingyu Kong, Guanjun Wang, Haofan Jin, Lei Zhou, Dehai Yu, Chao Niu, Wei Han, Wei Li, et Jiuwei Cui. 2014. « Low-dose ionizing radiation induces direct activation of natural killer cells and provides a novel approach for adoptive cellular immunotherapy ». *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 29 (10): 428–434.
- Yilmaz, Atilla, Marlene Lochno, Friedemann Traeg, Iwona Cicha, Christine Reiss, Christian Stumpf, Dorette Raaz, et al. 2004. « Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques ». *Atherosclerosis* 176 (1): 101–110.
- Yona, Simon, Ki-Wook Kim, Yochai Wolf, Alexander Mildner, Diana Varol, Michal Breker, Dalit Strauss-Ayali, et al. 2013. « Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis ». *Immunity* 38 (1): 79–91.
- Yu, Xiao-Hua, Yu-Chang Fu, Da-Wei Zhang, Kai Yin, et Chao-Ke Tang. 2013. « Foam cells in atherosclerosis ». *Clinica chimica acta* 424: 245–252.
- Zhou, Xinghua, Gabrielle Paulsson, Sten Stemme, Göran K Hansson, et others. 1998. « Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. » *The Journal of clinical investigation* 101 (8): 1717–1725.
- Ziegler-Heitbrock, Loems. 2007. « The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation ». *Journal of leukocyte biology* 81 (3): 584-92.
- Ziegler-Heitbrock, Loems, Petronela Ancuta, Suzanne Crowe, Marc Dalod, Veronika Grau, Derek N Hart, Pieter JM Leenen, et al. 2010. « Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood ». *Blood* 116 (16): e74–e80.
- Zizzo, Gaetano, et Philip L. Cohen. 2013. « IL-17 Stimulates Differentiation of Human Anti-Inflammatory Macrophages and Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils in Response to IL-10 and Glucocorticoids ». *The Journal of Immunology* 190 (10): 5237-46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203017>.
- Zizzo, Gaetano, Brendan A. Hilliard, Marc Monestier, et Philip L. Cohen. 2012. « Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction ». *The Journal of Immunology* 189 (7): 3508-20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200662>.

Titre : Effets des faibles doses de rayonnements ionisants γ dans la pathologie athéromateuse : étude des mécanismes de modulation de l'inflammation.

Mots clés : Irradiation, Faibles doses, Débit de dose, Athérosclérose, Inflammation, Immunomodulation.

Résumé : Il est bien établi que l'exposition aux fortes doses de rayonnements ionisants favorise le développement de l'athérosclérose, une pathologie inflammatoire chronique qui affecte la paroi des vaisseaux de gros et moyens calibres. Cependant les mécanismes biologiques des faibles doses de rayonnements ionisants sur cette pathologie sont moins bien documentés. Plusieurs travaux ont néanmoins mis en évidence que dans un contexte d'athérosclérose, l'exposition aux doses faibles pouvait, contrairement aux doses fortes, entraîner une réponse en faveur d'une modulation de l'inflammation et une hausse de la stabilité des plaques d'athérome (Le Gallic et al. 2015a; T. G. Ebrahimian et al. 2017; Mancuso, Pasquali, Braga-Tanaka III, et al. 2015; Mitchel et al. 2011). Ces études suggèrent que la dose et le débit de dose sont déterminants dans la survenue de cette réponse adaptative. L'objet de cette thèse est donc d'étudier les mécanismes adaptatifs immunomodulateurs mis en jeu dans l'athérosclérose après exposition à des doses faibles et modérées. A cette fin, l'évaluation de l'impact de la dose et du débit de dose dans cette réponse a été étudiée, puis les mécanismes immunitaires précoces et leurs conséquences à long terme sur la pathologie athéromateuse ont été explorés. Une première approche expérimentale a été réalisée sur un modèle de souris prédisposées à l'athérosclérose (ApoE^{-/-}) exposées à des doses faibles et modérées d'irradiation γ à débits de dose chroniques et aiguës. Nous avons ainsi pu observer que les populations immunitaires ont une réponse non linéaire en fonction de la dose et dépendante du type cellulaire étudié.

Les populations monocytaires pro-inflammatoires étaient diminuées à l'ensemble des doses tandis que des populations lymphocytaires pro-inflammatoires étaient diminuées uniquement à très faible dose et débit de dose. Dans un second temps, une autre approche expérimentale sur un modèle ApoE^{-/-} fut dédiée à l'étude des mécanismes précoces post-irradiations (24 heures et 10 jours) sur principalement la polarisation des macrophages ainsi que les conséquences tardives sur le phénotype des plaques. Ainsi, 24 heures après irradiation, nous avons constaté une régulation à la hausse de gènes à action anti-inflammatoire (Chil-3 et Retnla) ainsi qu'une augmentation concomitante de la sécrétion en interleukine-10 chez les macrophages de type M2. Concernant les études à long terme, nous n'avons pas observé de modifications par rapport à la stabilité des plaques d'athérome, néanmoins, la teneur en macrophages intra plaques était significativement abaissée à la plus forte des doses appliquées. Par ailleurs la proportion en monocytes spléniques était significativement augmentée après 100 jours, laissant entrevoir une hausse possible du stockage splénique des monocytes à long terme enclenchée par l'irradiation. L'ensemble de ces résultats confirme l'occurrence d'un mécanisme adaptatif immunomodulateur à doses faibles et modérées dans le contexte de l'athérosclérose. Cette réponse est néanmoins dépendante du type cellulaire étudié et a des conséquences différentes en fonction de la dose et du débit de dose étudié. De plus, lors de l'application d'une dose modérée, nous avons mis en évidence la présence d'un mécanisme adaptatif observé plusieurs mois après irradiation au niveau de la plaque d'athérome et au niveau du système immunitaire.

Title : Effects of low doses of ionizing radiation γ in atherosclerosis : study of the mechanisms modulating inflammation.

Key words : Irradiation, Low dose, Dose rate, Atherosclerosis, Inflammation, Immunomodulation.

Abstract : It is well established that exposure to high doses of ionizing radiation promotes the development of atherosclerosis, a chronic inflammatory pathology that affects the walls of large and medium-gauge vessels. However, the biological mechanisms of low doses of ionizing radiation on this pathology are less well documented. Several studies have nevertheless shown that in a context of atherosclerosis, exposure to low doses can, unlike high doses, lead to a response in favor of modulation of inflammation, and an increase in the stability of atheromatous plaques (Le Gallic et al. 2015; Ebrahimian et al. 2017; Mancuso et al. 2015; Mitchel et al. 2011). These studies suggest that dose and dose rate are critical to the occurrence of this adaptive response. The purpose of this thesis is therefore to study the immunomodulatory adaptive mechanisms involved in atherosclerosis after exposure to low and moderate doses. To this end, the impact of dose and dose rate in this response has been studied, then the early immune mechanisms and their long-term consequences have been explored. A first experimental approach was performed on a model of atherosclerotic predisposed mice (ApoE^{-/-}) exposed to low and moderate doses of radiation γ at chronic and acute dose rates. We were able to observe that immune populations have a non-linear response to dose and dependent on the cell type studied.

Pro-inflammatory monocyte populations were decreased at all doses while pro-inflammatory lymphocytes were decreased only at very low doses and dose rates. In a second step, another experimental approach on ApoE^{-/-} model was dedicated to the study of early post-irradiation mechanisms (24 hours and 10 days) on primary monocytes and macrophages. In addition, the late consequences in pathology by external exposure to ionizing radiation γ at low and moderate doses (100 days) were also explored. Thus, 24 hours after irradiation, we observed an upregulation of genes with anti-inflammatory action (Chil-3 and Retnla) as well as a concomitant increase in interleukin-10 secretion in M2 macrophages. In the long-term studies, we did not observe any changes with respect to the stability of the atheroma plaques, however, the intra-plate macrophage content was significantly lowered at the highest of the applied doses. In addition, the proportion of splenic monocytes was significantly increased after 100 days, suggesting a possible increase in long-term splenic monocyte storage triggered by irradiation. All these results confirm the occurrence of an adaptive immunomodulatory mechanism at low and moderate doses in the context of atherosclerosis. This response is nevertheless dependent on the cell type and has different consequences depending on the dose and dose rate applied. Moreover, when a high dose rate is applied at a moderate dose, we have demonstrated the presence of an adaptive mechanism observed several months after irradiation at the level of the atheroma plaque and at the level of the immune system.